

**DR. VICTOR BARBA LÓPEZ**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
**PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “**Estudio estructural de unión de TLA-1 S70G con Sulbactam**”, que presenta la alumna **Dinorah Gallardo Navarro (10019227)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM		
Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo CIDC-UAEM		
Dra. Alejandra Hernández Santoyo Instituto de Química-UNAM		
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM		
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM		



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA** | Fecha:2020-06-16 10:59:15 | Firmante

JctC67B9Z3OVIgc9mA/eLsL1vdjND/2VxCRXgcyAipQEfBaizqiiWWsX7UPez51QtggZuU1bTDsrSB+C+N3JL5fp3KB/KqUS2QaqDjQD4EEVRawQF/9Ty03XvpRYyYx5LHf9Icni0Sst9UJf146aXKe0rsWE4MhZUJlov5nQVZkG89c3FewSsT9aADhklyni8HGzCFNpdjLH4yeMA1IF7shFeTBGTOE93E62UiRvtdGsMGpNgZ3Rivn8jRYs7zMXpXvO0rbpP6fiWiZ3WjG44idJxYS/Kc0DU9AgCsG+OBIYxvzvvhg+beGi0btdYISOQYOvoN2RR6T07djvvpPw==

**ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA** | Fecha:2020-06-16 10:59:42 | Firmante

tuLoQbkMVTHDYRNyFN2t0B8NjppMbADq2cW2xKf4xzynTnfe3Lil7kKQwc9XHf4MSeRb1HfAsq9U+6cKiMUIT/nq/STbSr9jpo0MwUxw+Nul4P9niD+NRELwq9ePYC0dVKIRANJ4tZKH56KFqKsCXJL0E3fnU6KYXWjsAmmmGcH8Vb2S4cFW7vwEW1P3PBcWPoxZi5+QhiMm9HbupFuNgErL0XH0GS9hYKOE++pLm56XjBze80pOjxi7mj1mMtOOxnm97IN14bypgLNsV82oHcNUvxXizBlhPiov4mq0Vwq+75jesgWY4dkub/DNIHVPIJIRtoAkjUSnPCYg==

**LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO** | Fecha:2020-06-16 11:00:22 | Firmante

IMShg54tctd7VnWvIL02BbS4W3HMgsqQ1w1UlzhzfQommEYIKaa3tllADtCY0c9H+QfVzPwQxdlCuekm2nCT2dWR2Zkg5twzass74E2Xzd4DI06GtngPzGdPi3beGyl8ed6mh4uEJN4agFncmysbJKZbcx9NhqRqNBH9Fn5YT70OMy98+E+LMjKOoQfG2NGUxlbNycMUUrf2y2daNiPthK42v0qlZ4EaYHq6ITkdL36/3UY/dR0Nr3PHJbQJAbD+7Nb9ZzCNs/dvxKMEKxPIIU71N6stTnlkQJp9JPa0bZxg+M22jPmdFccllhBiqyATBVDJ4Yfck8RKNHOyg==

**CARMEN NINA PASTOR COLON** | Fecha:2020-06-16 11:12:02 | Firmante

kbbk2/OyLIBIVbUkKsd+JY5mZZIqnbOc7gmAsacg4gW1Cg/oJq7aj900SrKnwum+k8XOXq6WSlnR/VibLQSSy6hydbDWw1cBO+qeroX+O5wiQ+CEaMHr1qlikt+CWtuzbRloqWd6j9efr1JdLFV00iW2DjPkdmlkzHYPCrB2H30Oq8L0BSQQvnTTHxFl4PIts+6tuZiWXXQzRmylKuzCNkP+oT9srzsT74X+1rRJ+vLxXko8VPqxk2Xs+AFATqPhs95HW04kfgTpvM9oh0FgPu6U84tc12BnS7BpY3NslvMk4JQ64TxK2HCP5TIRfvdti5YveLEG/aWuoxRV4uVA==

**ALEJANDRA HENÁNDEZ SANTOYO** | Fecha:2020-06-16 11:51:21 | Firmante

N1ygleQ/GVru28fg6Tyw9beT5dCNsQ7JfBk+QdbPqxxagxNaP0071ApLzkzPaAk8/cBBagEzNsiqRIHgn/mwvVxSISQGoRwNlcDwuU/BC5MYBrkonqmx827HspSF8GFM849CPH9bE3ATJX3qqciCGwnPlouaR9a7WozhpVmgQiXDfADbNsd26KJ2KRkoqJhZUSAuusBnsuCXRF29QknGJotrp7F4c81wU6p3sy178czkr+MdkeNPjMJ13N1BC8Zp7ioWTasuUOw2JhGFmbjkPFf0okseFue5Cwj00SZhQq592wpySaOb38jYJyXJjss1yv9Gxh+ngqO13FLKr/wWw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



E4pAV7

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/X4eX7kVqJBncAPURg3A2mXj3NmhDfVaM>





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA MOLECULAR

**“ESTUDIO ESTRUCTURAL DE UNIÓN DE TLA-1 S70G CON SULBACTAM”**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Dinorah Gallardo Navarro

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Enrique Rudiño Piñera, Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

Junio, 2020



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA MOLECULAR

**“ESTUDIO ESTRUCTURAL DE UNIÓN DE TLA-1 S70G CON SULBACTAM”**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Dinorah Gallardo Navarro

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Enrique Rudiño Piñera, Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

Junio, 2020

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: Dra. Carmen Nina Pastor Colón**

**SECRETARIO: Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo**

**VOCAL: Dra. Alejandra Hernández Santoyo**

**SUPLENTE: Dr. Ramón Alberto Batista García**

**SUPLENTE: Dr. Enrique Rudiño Piñera**

Este proyecto fue realizado en el laboratorio 8 del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Enrique Rudiño Piñera.

Los experimentos realizados en esta Tesis fueron apoyados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). No. de CVU 826368. Se agradece al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM), del Instituto de Química, UNAM y al *Advanced Photon Source* (APS) del Departamento de Energía de Estados Unidos de América por la difracción de los cristales obtenidos.

## RESUMEN

La resistencia bacteriana a antibióticos es un problema a nivel mundial. En el 2017 la organización mundial de la salud, OMS, reportó una lista de microorganismos resistentes a antibióticos a los cuales se les debe de dar prioridad a la investigación, siendo que todos los microorganismos del grupo de prioridad crítica son resistentes a **antibióticos  $\beta$ -lactámicos**. El principal mecanismo de resistencia por parte de las bacterias es la **producción de  $\beta$ -lactamasas**, enzimas que hidrolizan a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. **En el 2000 Silva y colaboradores caracterizaron a una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) endémica de México, llamada TLA-1, la cual, pertenece a la clase A y a la subclase A2 de las  $\beta$ -lactamasas**, subclase poco estudiada y cuya relevancia ha incrementado en los últimos años. En este trabajo se determinó la estructura de la mutante TLA-1 S70G sola y en complejo con sulbactam, en continuación a estudios previos de nuestro laboratorio donde se determinó la estructura cristalográfica de la BLEE TLA-1 en forma silvestre y en complejo con el inhibidor ácido clavulánico, donde se observó algo que no había sido reportado antes, dos diferentes intermediarios de ácido clavulánico unidos covalentemente a dos serinas la 70 y la 237. En este trabajo se encontró al intermediario trans-enamina del sulbactam en el sitio activo formando dos puentes de hidrogeno con los residuos Thr 235 y Gly 217, no se encontró formando una **unión covalente con la Ser 237, la cual tiene un 40% de conservación en  $\beta$ -lactamasas de la subclase A2**, lo que deja en duda cual residuo hidrolizó al sulbactam, siendo también una posible candidata a ser la segunda serina catalítica de TLA-1, la Ser 130. Si bien, se necesitan realizar más estudios para concluir cual serina tiene actividad catalítica en la mutante de TLA-1 S70G, este trabajo en conjunto con la tesis de Cifuentes *et al.*, 2019, demuestran que TLA-1 es la primer BLEE con dos serinas catalíticas, lo cual tendrá importantes implicaciones en el futuro desarrollo de inhibidores de BLEE.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre Mayra Navarro y a mis hermanos Óscar y Alán Gallardo por su apoyo incondicional, por sus palabras llenas de sabiduría y consuelo, por ser un ejemplo de responsabilidad, ingenio, creatividad y esfuerzo.

A toda mi familia regia y chilanga, sentí todo su amor y apoyo hasta Cuernavaca.

Al Dr. Rudiño, por recibirme en su grupo, por ser paciente al enseñarme, por su calidez como ser humano, por su confianza, por estar siempre de buen humor y al pendiente mis avances, por los cacahuates y las tazas de café.

A mis compañeros del L8 por todo lo que les aprendí, y por lo mucho que me ayudaron, especialmente a Cristina, Ángela, Ricardo y Alexis que sin su compañía mi estancia hubiera sido muy aburrida.

A los tallerines gracias por su amistad y por todas nuestras tertulias.

A Armando por complementarte tan maravillosamente, por acompañarme de la mano en cada acierto y tropiezo, por ser la calma en mi tormenta.

A todos mis amigos especialmente a Ana Sofía, Perla, Joyce, Ana Cristina, Maricarmen y Mayra.

A CONACyT por la beca otorgada para realizar mi maestría.

A Harley, Ivy, Talia y Robin por ser mi motivo.

A mi papá, un beso hasta el cielo.

## ÍNDICE

Introducción.....	11
<b><math>\beta</math>-lactamasas.....</b>	<b>12</b>
<b><math>\beta</math>-lactamasas de la clase A.....</b>	<b>13</b>
<b><math>\beta</math>-lactamasas de la subclase A2.....</b>	<b>17</b>
<b><math>\beta</math>-lactamasas de espectro extendido.....</b>	<b>18</b>
<b>Inhibidores de <math>\beta</math>-lactamasas.....</b>	<b>20</b>
Antecedentes.....	22
TLA-1.....	28
Justificación.....	32
Hipótesis.....	33
Objetivo.....	34
Objetivos específicos.....	34
Metodología.....	35
Transformación.....	35
Expresión.....	35
<b>Lisis.....</b>	<b>36</b>
Purificación.....	36
Prueba de actividad.....	36
Concentración.....	37
Cristalización.....	37
Determinación y análisis de la estructura.....	38
Resultados y Discusión.....	42
Expresión y Lisis celular.....	42
Purificación y Concentración.....	42
Cristalización.....	44



Determinación y análisis de la estructura.....	45
Conclusiones.....	68
Perspectivas.....	69
Bibliografía.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formula estructural <b>desarrollada del anillo <math>\beta</math>-lactámico</b> y tipos de <b>antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos</b> .....	11
Figura 2. Comparación estructural entre la penicilina y enlace D-ala-D ala.....	12
<b>Figura 3. Dominios de las <math>\beta</math>-lactamasas de clase A</b> .....	14
Figura 4. Mecanismo de catálisis propuesto para las $\beta$ -lactamasas A1.....	16
Figura 5. Principales diferencias entre $\beta$ -lactamasas de las subclases <b>A1 y A2</b> ...17	
<b>Figura 6. Distribución de los residuos conservados en <math>\beta</math>-lactamasas A2</b> .....	18
<b>Figura 7. Distribución de mutaciones comunes en <math>\beta</math>-lactamasas de la familia TEM y SHV que dan el fenotipo de espectro extendido</b> .....	19
Figura 8. Formula estructural desarrollada de los inhibidores más usados.....	20
Figura 9. Mecanismo propuesto de inhibición <b>de <math>\beta</math>-lactamasas A1</b> .....	21
<b>Figura 10. Características de <math>\beta</math>-lactamasas A2 en la estructura de PER-1</b> .....	24
Figura 11. <b>Características de <math>\beta</math>-lactamasas A2 en la estructura de PER-2</b> .....	25
<b>Figura 12. Características de <math>\beta</math>-lactamasas A2 en la estructura de TLA-3</b> .....	26
Figura 13. Estructura tridimensional de TLA-1.....	28
Figura 14. Sitio activo de TLA-1 con dos moléculas de ácido clavulánico.....	29
Figura 15. Representación bidimensional de las interacciones entre el ácido clavulánico y TLA-1.....	30
Figura 16. Diagrama del plasmido pJ411 con el gen de TLA-1.....	35
Figura 17. Formula estructural desarrollada de la nitrocefina intacta e hidrolizada .37	
Figura 18. Diagrama de un pozo en una placa para poner pruebas de cristalización por el método difusión de vapor por de gota sedente.....	38
Figura 19. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% mostrando las diferencias entre la cepas inducida y no inducida con IPTG.....	42
Figura 20. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% mostrando los carriles donde eluyó la proteína purificada.....	43

Figura 21. Resultado prueba de actividad y gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% mostrando a la proteína concentrada.....	43
Figura 22. Diagrama de la condición de cristalización y fotos de cristales obtenidos	45
Figura 23. Estructuras de los cristales de TLA-1 S70G y superposicionamiento de los sitios activos.....	49
Figura 24. Representación bidimensional de las interacciones entre enzimas y ligandos de ambas estructuras obtenidas.....	50
Figura 25. Gráficos de Ramachandran.....	51
Figura 26. Sitio activo del TLA-1 S70G con menor tiempo de remojo con una molécula de TRIS en el sitio activo.....	52
Figura 27. Sitio activo de TLA-1 S70G con mayor tiempo de remojo con diferentes ligandos.....	53
Figura 28. Mapas de omisión de cada ligando probado en el cristal de TLA-1 S70G con mayor tiempo de remojo con sulbactam.....	54
Figura 29. Mapas de densidad electrónica del intermediario trans-enamina en diferentes estructuras de $\beta$ -lactamasas subclase A1 depositadas en el PDB.....	55
Figura 30. Distancias entre la Ser70 y Ser 237 con activadores o posibles activadores.....	58
Figura 31. Agujero de oxianión en TLA-1 en complejo con ácido clavulánico.....	59
Figura 32. Alineamiento de <b>493</b> $\beta$ -lactamasas de la subclaseA2.....	60
Figura 33. Distancias entre Ser 238 y Ser 70 en distintas $\beta$ -lactamasas de la subclase A2.....	61
Figura 34. Estructura tridimensional de TLA-1 con los residuos 100% conservados en $\beta$ -lactamasas A2.....	63
Figura 35. <b>Cladograma de <math>\beta</math>-lactamasas A2</b> .....	64
Figura 36. Distancias entre Ser 130, Lys 234 y el intermediario trans-enamia del sulbactam.....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla cristalográfica de TLA-1 S70G con TRIS en el sitio activo.....	47
Tabla 2. Tabla cristalográfica de TLA-1 S70G con el intermediario trans-enamina del sulbactam en el sitio activo.....	48
Tabla 3. Estructuras de $\beta$ -lactamasas en complejo con sulbactam depositadas en el PDB.....	55
Tabla 4. Valores de PDA en distintas $\beta$ -lactamasas en complejo con sulbactam.....	56

## INTRODUCCIÓN

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son moléculas que constan de un anillo  $\beta$ -lactámico de tres carbonos y un nitrógeno (Fig. 1). Se han clasificado con base en su estructura química en cuatro principales grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactamas, donde a excepción de los monobactamas, el anillo  $\beta$ -lactámico está unido a un anillo de tiazolidina, dihidrotiazina, o pirrolina respectivamente. (Fig. 1) (Fernandes, 2013).

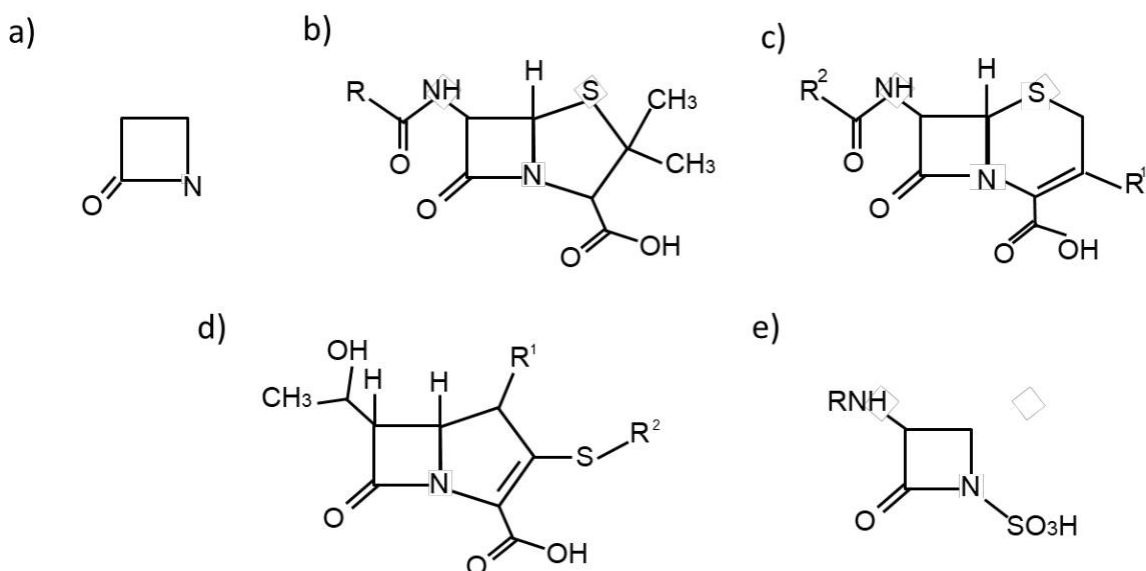


Figura 1. Fórmula estructural base de los distintos tipos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos a) anillo  $\beta$ -lactámico, b) penicilina, c) cefalosporina, d) carbapenémico y, e) monobactamas. Modificado de Tooke, 2019).

Estos antibióticos inhiben a las proteínas de unión a penicilina (PBP), proteínas encargadas del entrecruzamiento entre las cadenas de ácido acil murámico y acil glucosamina que componen la pared celular bacteriana. El ácido acil murámico tiene un pentapéptido unido cuya composición varía entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas pero siempre termina en dos residuos de D-alanina. El entrecruzamiento del pentapéptido de una cadena, con el de otra, es responsable de la rigidez de la pared celular, la cual confiere protección contra la presión osmótica interna a la bacteria (Wilke *et al.*, 2005). Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son **considerados como inhibidores peptidomiméticos ya que el enlace  $\beta$ -lactámico es**

muy similar al enlace D-Ala-D-Ala del pentapéptido de la pared de mureína, especialmente en la distribución de tres regiones con carga potencial negativa por los grupos carbonilo y carboxilo (Fig. 2) (Zapun *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2013). El enlace  $\beta$ -lactámico es lábil y reactivo; éste acila a la serina del sitio activo de las PBP, lo que resulta en una enzima incapaz de realizar el entrecruzamiento de las cadenas y consecuentemente evita la formación de la pared celular, lo que finalmente lisa a la bacteria debido a la presión osmótica; también la acumulación del precursor de la pared celular activa un sistema autolítico celular. (Babic *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2013).

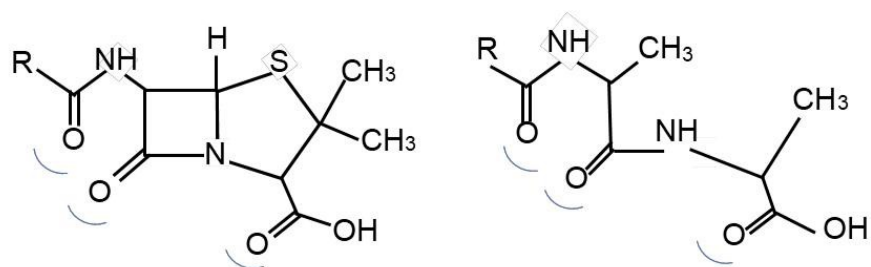


Figura 2. Comparación estructural de la penicilina y el enlace D-Ala-D-Ala En azul se marcan las 3 zonas de potencial electrostático negativo. Modificado de; Zapun 2008.

## $\beta$ -lactamasas

Las bacterias han desarrollado diversos métodos para contender con los antibióticos, como la producción de PBP que tengan baja afinidad por los antibióticos, como el caso de *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, las cuales tienen PBP **resistentes a inactivación por antibióticos  $\beta$ -lactámicos** debido a mutaciones puntuales. Otro método es impedir la entrada del antibiótico alterando la permeabilidad de la membrana mediante porinas modificadas que restrinjan la entrada de ciertos antibióticos, como en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*; también lo hacen por medio de bombas de flujo que expulsan al antibiótico una vez que entró al citosol; aunque el mecanismo más común es la producción de enzimas que modifiquen o degraden al antibiótico. (Babic *et al.*, 2006; Wilke *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2013)

**Las  $\beta$ -lactamasas** son enzimas **que inactivan a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos**, hidrolizando irreversiblemente **el anillo  $\beta$ -lactámico** que contienen estos fármacos. La producción de estas enzimas es el principal mecanismo de resistencia a **antibióticos  $\beta$ -lactámicos** en bacterias Gram-negativas, ya que son enzimas muy eficientes. **Las  $\beta$ -lactamasas** son capaces de hidrolizar un amplio intervalo de antibióticos, a pesar de lo anterior es limitado el número de estructuras moleculares descritas. (Bush *et al.*, 2018). **Las  $\beta$ -lactamasas** son producidas extracelularmente por bacterias Gram-positivas y en el periplasma en bacterias Gram-negativas. Los genes que codifican para estas enzimas pueden estar tanto en el cromosoma bacteriano como en elementos genéticos móviles, plásmidos y transposones (Lafond *et al.*, 1989).

Algunos estudios han propuesto que las  **$\beta$ -lactamasas** existen desde hace unas decenas de miles de años, antes siquiera de la presión selectiva por el uso de antibióticos. Un grupo de investigadores examinaron un metagenoma de sedimentos de Canadá de 30,000 años de antigüedad y encontraron secuencias **de aminoácidos de entre 53% y 84% de identidad con  $\beta$ -lactamasas** de la familia TEM, sin embargo, en este estudio no pudieron determinar si la antigüedad de las  **$\beta$ -lactamasas** es mayor (Song *et al.*, 2005).

Estas enzimas se encuentran agrupadas por su estructura primaria en cuatro clases A, B, C y D, todas pertenecen a la familia de las hidrolasas de serina reactiva, excepto las enzimas clasificadas como B, estas metaloenzimas realizan la hidrólisis vía uno o dos iones de zinc en el sitio activo (Ambler, 1980).

### **$\beta$ -lactamasas de la clase A**

Las  **$\beta$ -lactamasas** de clase A son las más abundantes, y se encuentran ampliamente distribuidas, en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, también son las que con mayor frecuencia se identifican en análisis clínicos y son las que han sido estudiadas a mayor detalle por técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN), mutagénesis, cristalografía de rayos X y dinámica molecular.

(Adamski *et al.*, 2015; Baig *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2001; Hermann *et al.*, 2009; Meroueh *et al.*, 2002; Morin *et al.*, 2009; Petrosino *et al.*, 1996; Roccatano *et al.*, 2005; Ruggiero *et al.*, 2017; Stojanoski *et al.*, 2015; Winkler *et al.*, 2014). Esta clase de enzimas hidroliza a una gran variedad de sustratos  $\beta$ -lactámicos.

Las  $\beta$ -lactamasas de clase A se distinguen a nivel de estructura primaria por tener los siguientes residuos conservados: Ser 70, Lys 73, Ser130, Asp 131, Asn 132, Lys/Arg 234, Thr/Ser 235, Gly236 y un asa  $\Omega$  cerca del sitio activo, que se caracteriza por la conservación del residuo Glu 166 (Ambler, 1980). En general la estructura **de las**  $\beta$ -lactamasas de la clase A está conservada y consiste en dos dominios: el dominio I compuesto de 5 hebras  $\beta$  y 2 hélices  $\alpha$  y el dominio II compuesto por al menos 6 hélices  $\alpha$  (Fig. 3) (Eiamphungporn *et al.*, 2018).

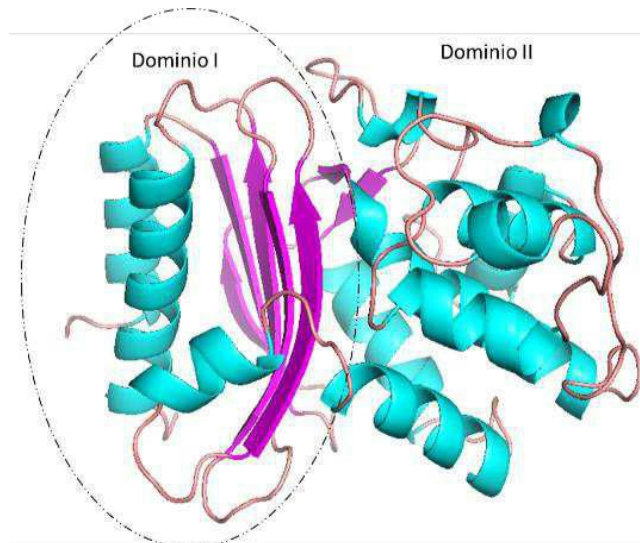


Figura 3. Dominios de las  $\beta$ -lactamasas clase A. Modificado de van den Akker, 2018

Las  $\beta$ -lactamasas de serina reactiva contienen varios motivos para reconocer y facilitar la hidrólisis **del enlace**  $\beta$ -lactámico: un sitio activo polar para interactuar con **los grupos carbonilos de los**  $\beta$ -lactámicos; un agujero de oxianión para atraer y estabilizar al **oxígeno del carbonilo en el anillo**  $\beta$ -lactámico; un grupo hidroxilo de la serina catalítica que haría el ataque al carbono del grupo carbonilo (el hidroxilo de la serina es activado por el Glu 166 o la Lys 73), que a su vez rompería el enlace entre este carbono y el nitrógeno del anillo; y residuos conservados involucrados en la deacilación que no estén presentes en las PBP como por ejemplo los



equitativos al Glu 166 activador de la serina o al Asp 131 (van den Akker *et al.* 2018). Sin embargo, las particularidades del mecanismo catalítico siguen en debate. La propuesta más aceptada consiste a grandes rasgos en la activación de la Ser 70 para realizar un ataque nucleofílico al carbono del grupo carbonilo del anillo  $\beta$ -lactámico. Para la activación de la Ser 70 se necesita que el Glu 166 actúe como receptor de protones, para así, vía una molécula de agua, desprotonar a la Ser 70. A consecuencia del ataque sobre el carbonilo se forma el complejo acil-enzima, que posteriormente será deacilado nuevamente mediante la desprotonación del Glu 166 vía otra molécula de agua dejando al antibiótico hidrolizado y a la enzima libre y activa (Fig. 4). Esta propuesta está respaldada por múltiples técnicas, como espectrometría Raman, mutagénesis acoplamiento molecular, cálculos QM/MM (Mecánica cuántica / Mecánica molecular) y especialmente cristalografía de rayos X, ya que ha permitido la obtención de las estructuras de diferentes  $\beta$ -lactamasas libres y en complejo con fármacos. (Adamski *et al.*, 2015; Dubus *et al.*, 1994; He *et al.*, 2016; Ibuka *et al.*, 2003; Miani *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2017; Sandanayaka *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 1999; Frase *et al.*, 2011; Heidari *et al.*, 2014; Helfand *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2018). Para que la catálisis suceda es importante que el Glu 166 esté desprotonado. En su ausencia, se ha visto que la Lys 73 es capaz de activar a la Ser 70, y para esto debe estar desprotonada. La lisina en las  $\beta$ -lactamasas de clase A normalmente tiene un pka atenuado a 8.0-8.5 y este cambio en su pka se debe a la hidrofobicidad del sitio activo (excepto por la Ser 70, Glu 166, y Lys 234); al solvente que rodea por completo a la Lys 73; y su proximidad con la Lys 234 (pka 11), también se cree que la unión con el sustrato puede afectar el valor de pka de la Lys 73. En ausencia del Glu 166 el pka de la Lys 73 baja a 6.0 lo que le permite estar desprotonada y llevar a cabo la reacción, aunque una manera menos eficiente (Golemi, 2004; Langan *et al.*, 2018; Meroueh *et al.*, 2005).

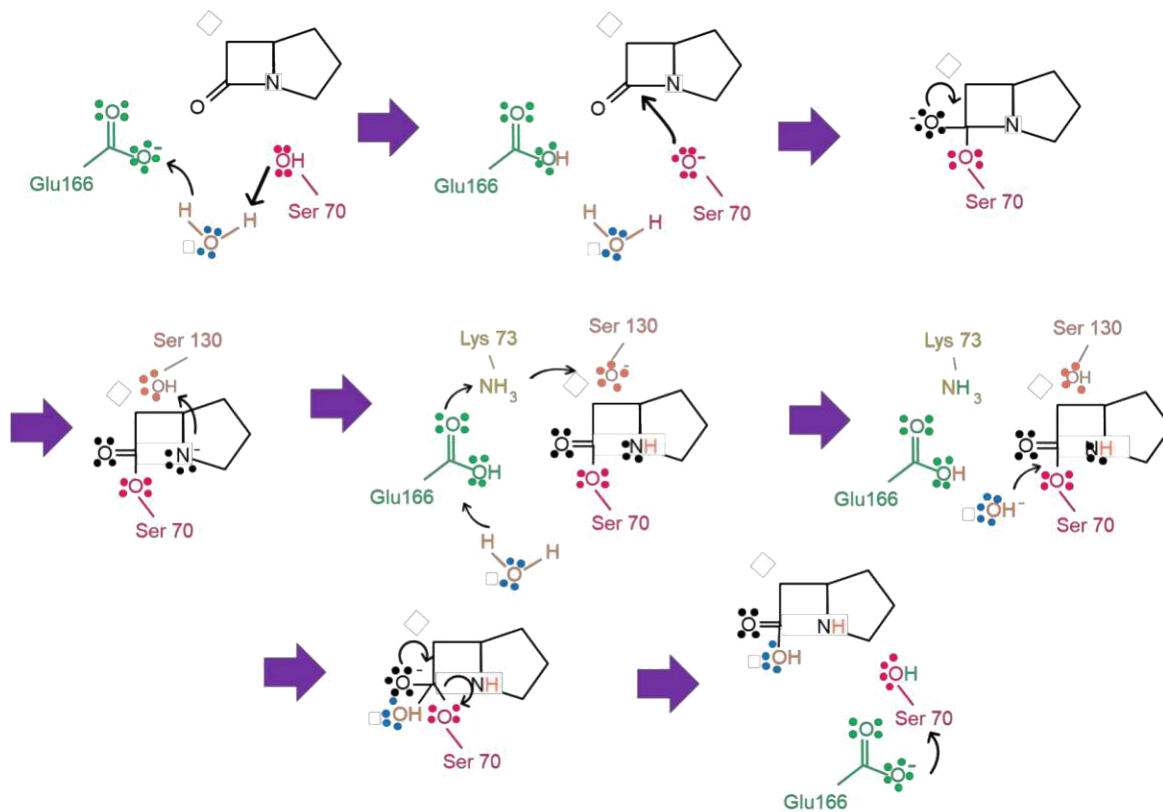


Figura 4. Mecanismo catalítico propuesto para las  $\beta$ -lactamasas de la subclase A1. Modificado de Tooke 2019

Algunas de las familias de  $\beta$ -lactamasas representativas de la clase A son: TEM, SHV, KPC y CTX-M que se encuentran altamente distribuidas en todo el mundo y más frecuentemente producidas por *E. coli* y *Klebsiellae spp.* Las  $\beta$ -lactamasas de la familia CTX-M son las más abundantemente distribuidas, su expresión confiere resistencia a antibióticos y están asociadas con infecciones extraintestinales, pero también se han encontrado ampliamente en el ganado en diferentes países, sugiriendo que el excesivo uso de antibióticos en el ganado es un factor importante a tomar en cuenta y una posible vía en la dispersión de la resistencia tanto por el consumo humano, como por su dispersión directa en el ambiente (Dantas *et al.*, 2020).

## $\beta$ -lactamasas de la subclase A2

Dentro de las  $\beta$ -lactamasas de Clase A hay una subclase muy poco estudiada que es la subclase A2, descubierta en el 2016 por Phillipon y colaboradores; ésta posee diversas características estructurales específicas, como la conformación del enlace peptídico entre el Glu 166 y el residuo 167 que es *Trans* en lugar de *Cis*. Cabe mencionar que la conformación *Cis* se encuentra conservada en la subclase A1, este cambio de *cis* a *trans* provoca un cambio en la conformación del asa  $\Omega$  en las  $\beta$ -lactamasas de la subclase A2. Otra diferencia es que en la subclase A2 existe **una inserción en el asa entre la lámina  $\beta$ -3 y  $\beta$ -4**. Se cree que estas características confieren una ampliación en la entrada del bolsillo en el sitio activo, lo que permite la hidrólisis de sustratos más voluminosos como las cefalosporinas (Ruggiero *et al.*, 2014).

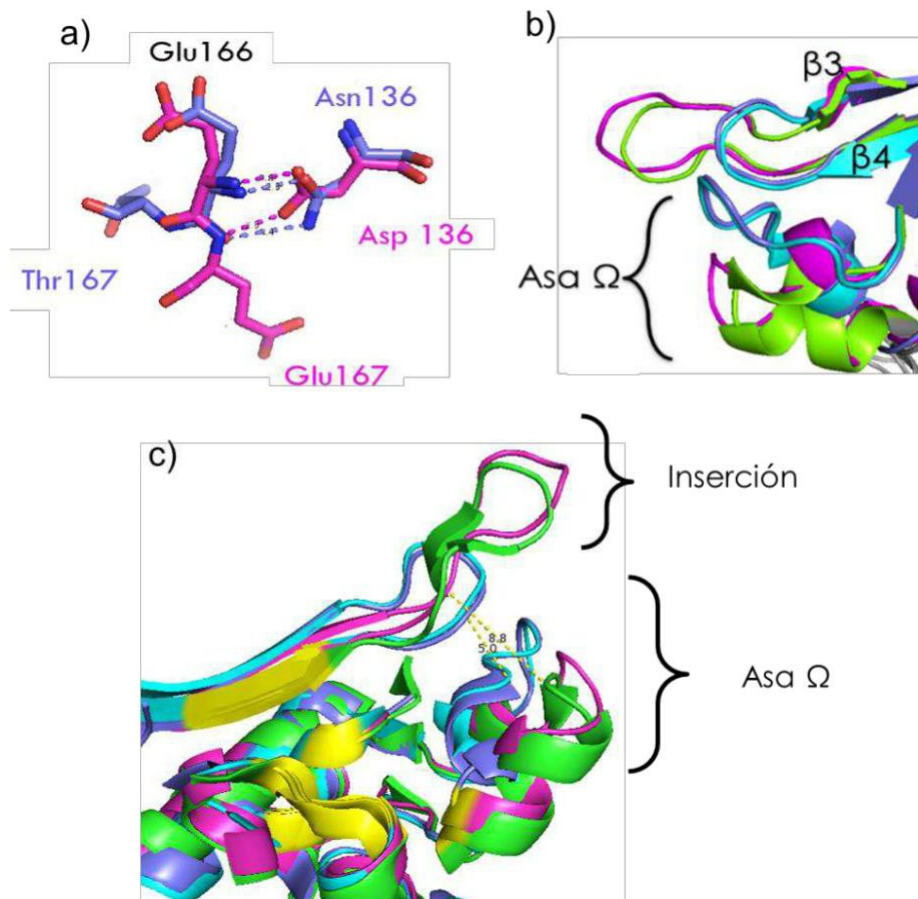


Figura 5. Principales diferencias entre  $\beta$ -lactamasas A1 y A2. a) cambio cis (A1 azul) a trans (A2 magenta) entre residuos 166 y 167, b) inserción entre láminas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 y acomodo del asa  $\Omega$ , (A1 azul y cian, A2 magenta y verde) c) tamaño de la entrada al sitio activo en A1 5 Å y en A2 de 8.9 Å.

Otra característica encontrada únicamente en las  $\beta$ -lactamasas de la subclase A2, es la conservación de los residuos Lys 40, Asn 61, Val 71, Thr 104, Cys 135, Asp 136, Met 169, Tyr 177, Asn 179, Met 211, His/Arg 233, Gly/Ala 243, Leu 252, Val 263, Phe 264, Val 265, Ser 268, y Asn 275, los cuales, al estar conservados, deben tener una función que no se conoce a la fecha (Fig. 6) (Philippon *et al.*, 2016). Adicionalmente, miembros de la subclase A2 han sido encontrados más frecuentemente en distintos aislados clínicos de pacientes en países como México, Turquía, Vietnam y Japón (Jin *et al.*, 2014; Poirel *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2000; Vahaboglu *et al.*, 2001).

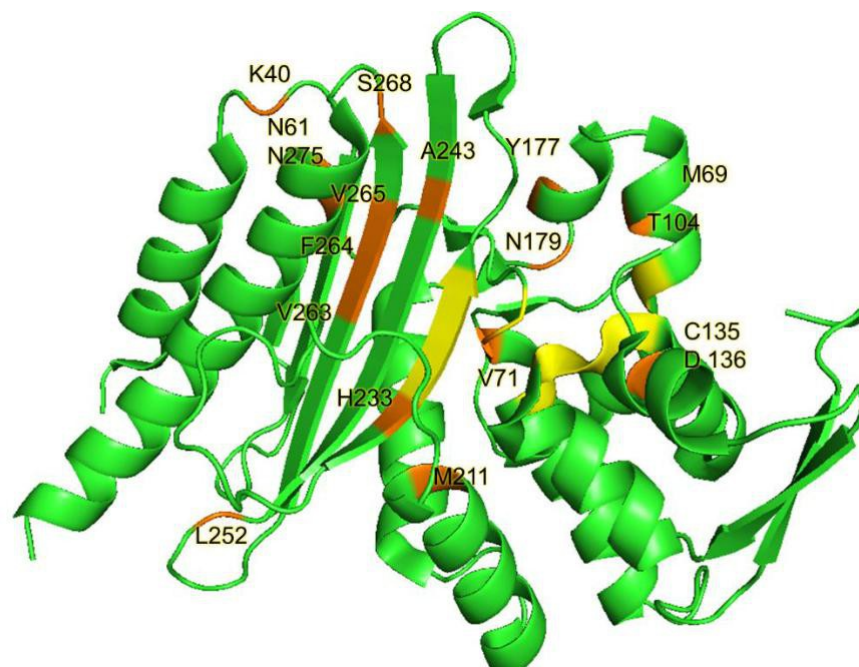


Figura 6. Distribución de los residuos conservados en  $\beta$ -lactamasas A2 (naranja) en PER-2 (sitio activo amarillo).

### **$\beta$ -lactamasas de espectro extendido**

Otro tipo de clasificación para las  $\beta$ -lactamasas atiende la variedad y tipo de sustratos que pueden hidrolizar. Las de espectro extendido (BLEE) se caracterizan por hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, brindando a la bacteria resistencia hacia este agente quimioterapéutico. Se ha observado que el fenotipo BLEE se correlaciona con un incremento en la flexibilidad del sitio activo (Wilke *et*

*al.*, 2005). En la clase A la **mayoría de las  $\beta$ -lactamasas** con fenotipo BLEE son derivadas de TEM y SHV, dos familias de  $\beta$ -lactamasas. TEM-3 fue la **primer  $\beta$ -lactamasa** derivada de TEM reportada con el fenotipo BLEE en 1963, y de entre las mutaciones más comunes que generan al fenotipo BLEE en las TEM están Glu104Lys, Glu164Lys, Met182Thr, Ala237Thr, Gly238Ser y Glu240Lys (Palzkill, *et al.*, 2018). **Por otro lado, las mutaciones en  $\beta$ -lactamasas SHV**, que dan origen al fenotipo BLEE más comunes son Leu35Gln Gly238Ser/Ala y Glu240Lys (Liakopoulos *et al.*, 2016). Cabe resaltar que las mutaciones Gly238Ser y **Glu240Lys suceden en ambas familias de  $\beta$ -lactamasas**, resaltando su importancia para desarrollar el fenotipo BLEE (Bradford *et al.*, 2001).

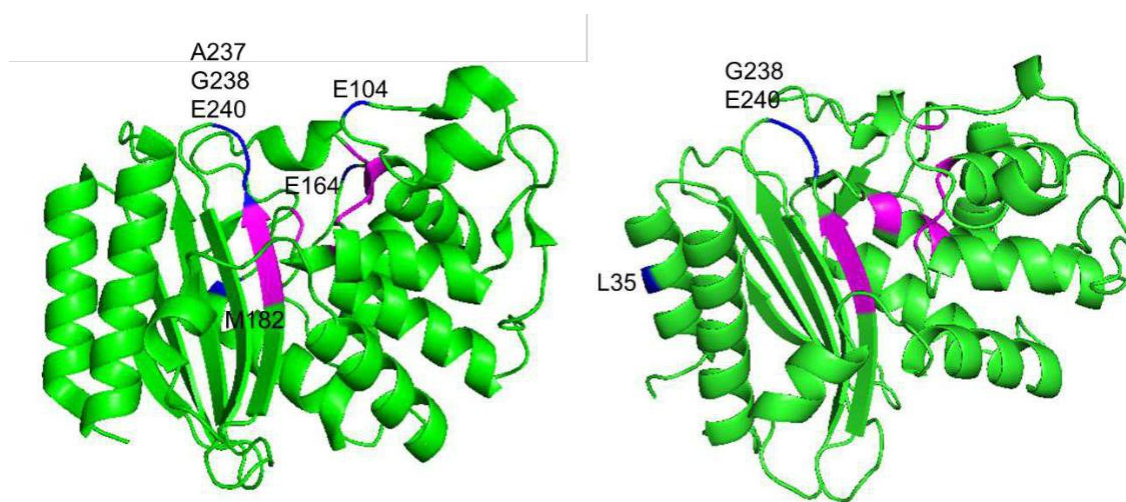


Figura 7. Distribución de las mutaciones más comunes (azul) en las familias TEM (izquierda) y SHV (derecha) que confieren el fenotipo BLEE, el sitio activo en magenta y la Ser 70 en amarillo

Existen  $\beta$ -lactamasas de la subclase A2 que no pertenecen a las familias TEM o SHV, pero que pueden tener el fenotipo BLEE, este es el caso de las familias PER, VEB, GES, TLA entre otras (Bradford, 2001). Las BLEE de la subclase A2 no comparten los residuos que otorgan el fenotipo de BLEE en la subclase A1, pero si es común que las mutaciones de la subclase A1 se encuentren cerca del asa  $\Omega$  y **la inserción entre la lámina  $\beta$ 3 y  $\beta$ 4, que son las principales características de la subclase A2 involucradas en el espectro hidrolítico extendido (Philippon *et al.*, 2016). La mayoría de las BLEE son de la clase A, siguiéndoles en abundancia la**

familia OXA de la clase D (Eiamphungporn *et al.*, 2018).

### Inhibidores de $\beta$ -lactamasas

La resistencia a la hidrólisis **por las  $\beta$ -lactamasas A1** puede lograrse usando inhibidores que se unan a la enzima (Fig. 8). Los inhibidores se administran junto con un antibiótico y son la mejor estrategia para combatir la resistencia a **antibióticos mediada por  $\beta$ -lactamasas**. Los inhibidores clásicos como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam contienen un anillo betalactámico, lo que permite la unión con la enzima y esta unión puede ser reversible o irreversible. El **tazobactam se ha reportado como el inhibidor más efectivo contra  $\beta$ -lactamasas tipo A**, esto debido a la formación de un intermediario trans-enamina más estable que el ácido clavulánico o el sulbactam, formando más puentes de hidrógeno que estabilizan su unión con la enzima y favoreciendo la inhibición reversible (Fraser *et al.*, 2011; Helfand *et al.*, 2003; Padayatti *et al.*, 2005).

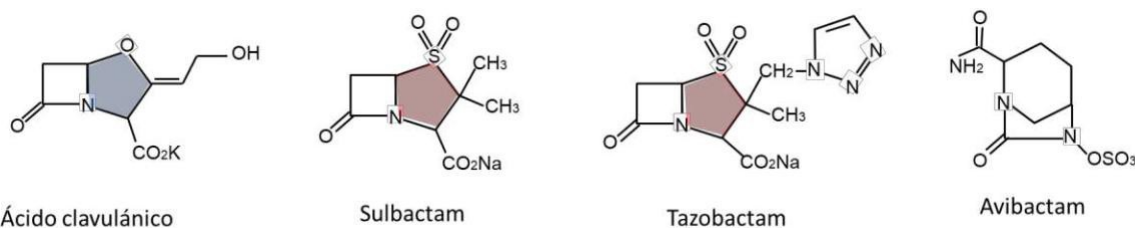


Figura 8. Fórmula estructural desarrollada de los inhibidores más usados. En azul el anillo oxazol y en rojo el anillo de tiazolidina. Modificado de Kalp 2009 y Jin 2017.

**La inhibición en las  $\beta$ -lactamasas de clase A1** comienza igual que la catálisis: las  $\beta$ -lactamasas reconocen a los inhibidores posicionando el grupo carboxilo en el sitio activo. Igual que con los antibióticos, el oxígeno del carbonilo se posiciona en el agujero del oxianión (conformado por los grupos amino de los residuos Met 69, Ser 70, Gly 236 y 237) dejando al carbono del carbonilo en posición para el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la Ser 70, activada previamente por el Glu 166. Posteriormente, se rompe **el anillo  $\beta$ -lactámico** y se genera un intermediario acil-enzima. A partir de este punto se forman varios intermediarios, que resulta en el

rompimiento del anillo oxazol (ácido clavulánico) o tiazolidina (tazobactam y sulbactam) (Fig. 8). La reacción puede continuar de manera reversible o irreversible mediante el fraccionamiento del inhibidor por un ataque nucleofílico al C5 por parte del grupo hidroxilo de la Ser130 y estos fragmentos pueden unirse covalentemente a la Ser 70 y/o Ser 130 (Fig. 9) (Heidari *et al.*, 2014; Kuzin *et al.*, 2001; Pagan-Rodriguez *et al.*, 2004). Este proceso se conoce ampliamente, aunque no por **completo en las  $\beta$ -lactamasas** de la clase A1, y se conoce aún menos en la clase A2.

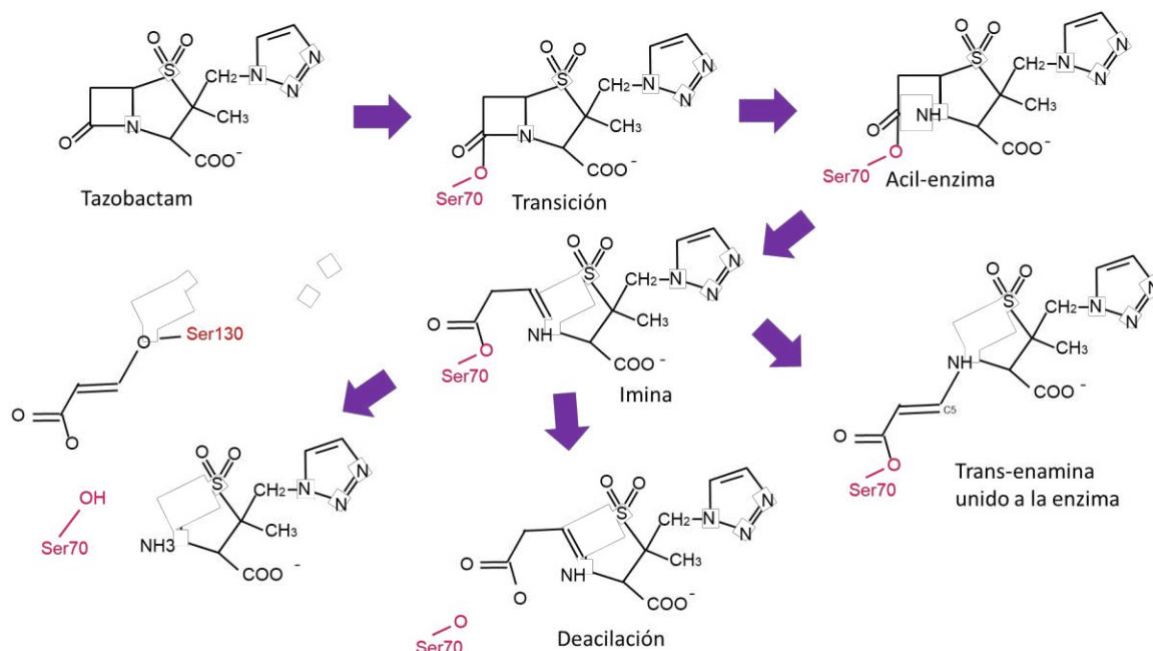


Figura 9. Mecanismo de **inhibición propuesto de  $\beta$ -lactamasas** de la subclase A1. Modificado a partir de Focco van den Akker, 2018.

En la industria farmacéutica **los inhibidores  $\beta$ -lactámicos** son los que menos se han desarrollado, siendo aprobados para el uso terapéutico en humanos el únicamente el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam, hasta el 2015 año en que fue **aprobado el uso de avibactam, el cual no es un inhibidor  $\beta$ -lactámico**, pero si es un **inhibidor de  $\beta$ -lactamasas**. En la actualidad, la investigación para el desarrollo de **inhibidores del tipo  $\beta$ -lactámicos** ha perdido prioridad frente al desarrollo de inhibidores de la síntesis de DNA, RNA o proteínas. (Pucci *et al.*, 2014).

## ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 y su uso clínico en los años 40's, **los antibióticos  $\beta$ -lactámicos** se convirtieron en los agentes quimioterapéuticos de mayor uso para tratar infecciones bacterianas, ya que representan el 60% de los antibióticos usados en todo el mundo. Por muchos años, se siguieron desarrollando nuevos antibióticos  $\beta$ -lactámicos para mejorar su potencia, su espectro de actividad, su farmacocinética y para contender contra la resistencia bacteriana a los antibióticos, dando como resultado las cefalosporinas y los carbapenémicos (Fig. 1). Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos tienen como blanco una proteína presente solo en procariotes, y esencial para la síntesis de la pared celular, por lo que son más seguros terapéuticamente en comparación con otros antibióticos que tienen como blanco moléculas existentes en células eucariontes. Sin embargo, el desarrollo y salida al mercado de nuevos antibióticos ha ido disminuyendo considerablemente en los últimos años, paradójicamente el descubrimiento de bacterias resistentes a estos ha ido en aumento y no se han descubierto nuevos antibióticos. Esta resistencia no ha incrementado únicamente por la falta de nuevos medicamentos, sino al mal uso de éstos mismos, tanto en humanos como en ganado, al uso en la agricultura y su dispersión en el ambiente, a través del agua, los animales salvajes y en los animales de consumo humano, contribuyendo así a la diseminación de la resistencia. Adicionalmente, los nuevos antibióticos, generan una presión selectiva en las bacterias, **que da como resultado la aparición de nuevas  $\beta$ -lactamasas** u otros mecanismos para la resistencia a antibióticos y medicamentos que quedan obsoletos rápidamente. Por lo tanto la persistente resistencia a antibióticos es uno de los principales problemas que amenazan la salud mundial ( Hubschwerlen *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2018; Wilke *et al.*, 2005).

La resistencia a antibióticos complica enfermedades y procedimientos quirúrgicos, prolonga la estadía en hospitales, incrementa el costo de los medicamentos y servicios médicos, y aumenta la mortalidad. Se ha reportado que aproximadamente 700,000 muertes al año a nivel mundial se le atribuyen a la resistencia microbiana, por lo que es una amenaza a nivel mundial. Debido a todo esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha enfatizado la urgencia de desarrollar nuevos



antibióticos y creó una lista en la que clasificó por prioridad a las bacterias resistentes para la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos. En esta lista las bacterias que están en la prioridad crítica son *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, y *Morganella spp.* todas con resistencia a **antibióticos  $\beta$ -lactámicos** (Tacconelli *et al.*, 2017). Gracias a esta lista se incrementó la investigación sobre los mecanismos que confieren resistencia a estos antibióticos, como los mecanismos catalíticos de **las  $\beta$ -lactamasas** (Shaikh *et al.*, 2015; WHO, 2014).

Si bien, **con la llegada de los inhibidores  $\beta$ -lactámicos** se generaron herramientas para contender con la amenaza de las bacterias resistentes, estos inhibidores ya no son suficientes, pues también dieron lugar a bacterias resistentes a inhibidores  $\beta$ -lactámicos. Lo anterior se debe a mutaciones puntuales que producen enzimas con menor afinidad, reafirmando aún más la necesidad de mejores opciones de **tratamientos para bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas** (Drawz *et al.*, 2010; Falagas *et al.*, 2016; Gniadkowski *et al.*, 2008). Actualmente la mayoría de las BLEE son codificadas en elementos génicos transferibles, como plásmidos, incrementando las posibilidades de ser adquiridas por otras bacterias presentes en los intestinos, el ambiente, el agua y los animales de consumo humano entre otros, al grado de convertir bacterias comensales en patógenas (Rahman *et al.*, 2018).

En México se han encontrado diferentes BLEE de las familias CTX-M, OXA, NDM y KPC, en *E.coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *K. pneumoniae* aisladas de pacientes pediátricos, y de la familia SHV, TLA, y GES de *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* y *E. coli* en pacientes adultos. Se han encontrado también  $\beta$ -lactamasas resistentes a antibióticos en los vegetales de diferentes locales de alimentos como miembros de las familias SHV, CTX-M, KPC, DHA, VIM, y OXA aislados de *E. cloacae*, *Serratia marcescens*, *K pneumoniae*, *Serratia fonticola*, y *Enterobacter aerogene*. Debido al aumento de reportes de BLEE en nuestro país, el estudio de estas enzimas y sus mecanismos de acción para el posterior

desarrollo de fármacos que las inactiven eficazmente es de vital importancia (Aquino *et al.*, 2018; Barrios *et al.*, 2012; Merida *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2018).

En el primer trabajo estructural sobre una  $\beta$ -lactamasa de la subclase A2 se enfocaron en PER-1 (PDB ID), la cual fue reportada en el año 2000 por Tranier y colaboradores, la secuencia de PER-1 es la que muestra mayor identidad con TLA-1 en estructuras que se encuentran almacenadas en el *Protein Data Bank* (PDB). La estructura de PER-1, obtenida por cristalografía de rayos X demostró tener características distintivas comparadas con otras BLEE las cuales son: una **conformación diferente en el asa  $\Omega$** . Esta región contiene estructuras secundarias altamente organizadas, que consiste en la formación de dos hélices cortas y una **lámina  $\beta$  antiparalela**. Este nuevo plegamiento del asa  $\Omega$  da como consecuencia un incremento significativo en el tamaño del sitio de unión (Fig. 10), adicionalmente, Tranier clasificó a TLA-1 dentro del grupo de las BLEE parecidas a PER (Tranier *et al.*, 2000).

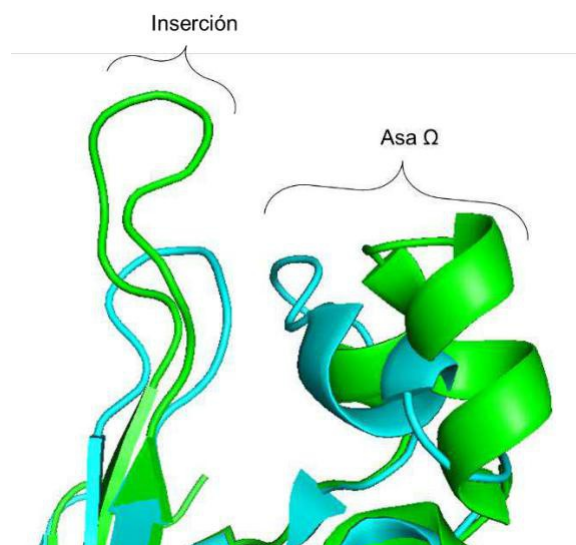
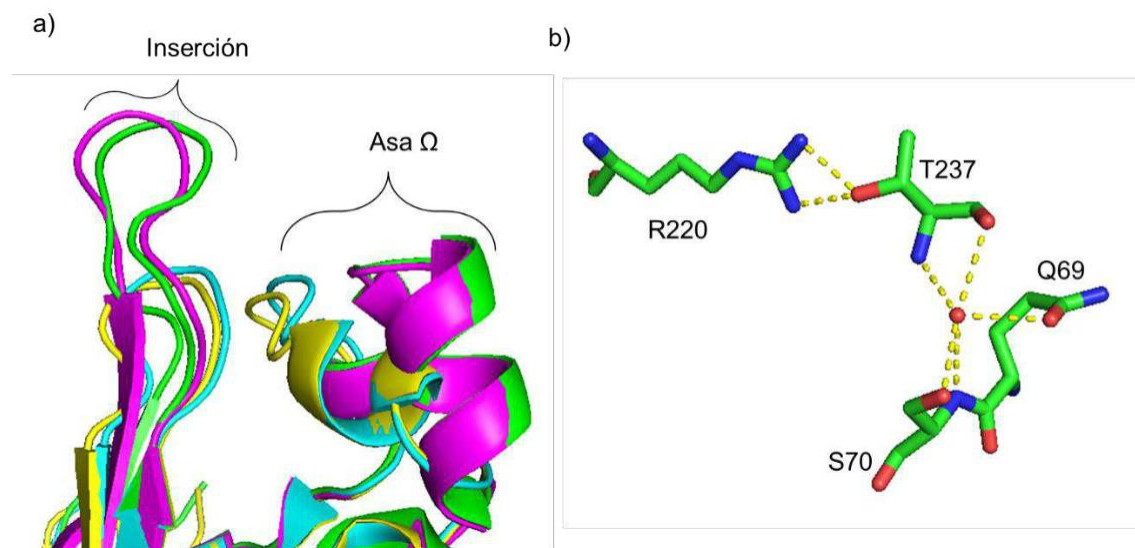


Figura 10. Comparación de la orientación del asa  $\Omega$  y la inserción en PER-1 (verde) y TEM-1 (cyan). PDB 1E25. Modificado de Tranier, 2000.

PER-2 fue la segunda **estructura tridimensional de una  $\beta$ -lactamasa** de la subclase A2 fue reportada en el 2014 por Ruggiero y colaboradores, la cual comparte una

identidad de secuencia de un 42% con TLA-1, en este artículo los autores describen **la misma conformación del asa  $\Omega$  que Tranier en el 2000, así como una inserción entre la lámina  $\beta 3$  y  $\beta 4$ . En este mismo trabajo describen características que probablemente se encuentren involucrados con la estabilización del sitio activo y describen una molécula de agua que estabiliza la extensión del asa entre las láminas  $\beta 3$  y  $\beta 4$ . También describen una red de puentes de hidrógeno importantes, los cuales, proponen que, estabilizan el sitio activo (Fig. 11). Esta red se da entre Gln 69, Ser 70, Arg 220, Thr 237, y una molécula de agua, este descubrimiento es importante ya que antes se había propuesto que el residuo Gln69 es un segundo ligando para el agua participante en la acilación y la Arg220 se le ha determinado como importante en la unión a antibióticos. Como parte final de este trabajo, se describe un modelo teórico de PER-2 en complejo con cefotaxima, ceftazidima y ácido clavulánico con el programa YASARA. Se utilizaron las estructuras de la  $\beta$ -lactamasa A1 TOHO-1 para indicar la posición inicial de cada ligando, y una vez obtenida, se realizaron minimizaciones de energía donde el modelo sugiere que el antibiótico se encuentra estabilizado por los siguientes residuos: Gln69, Ser130, Asn132, Glu 166, Thr235 y Thr237 por medio de puentes de hidrógeno. Este modelo en consecuencia predice la existencia de una cavidad catalítica mayor que permite el acomodo de un antibiótico voluminoso. (Tranier *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2000; Ruggiero *et al.*, 2014).**



**Figura 11. a) Comparación del asa  $\Omega$  y la inserción entre  $\beta 3$  y  $\beta 4$  entre Toho-1 (amarillo), TEM-1 (cian), PER-1 (verde) y PER-2 (magenta). b) Puentes de hidrogeno (línea punteada) entre Gln 69, Ser 70, Arg 220, Thr 237 y una molécula de agua en el sitio activo de PER-2. PDB 4D2O. Modificado de Tranier, 2000)**

En el 2017, TLA-3, otra estructura de una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido fue reportada por Jin y colaboradores. TLA-3 también tiene la inserción entre las hebras  $\beta 3$  y  $\beta 4$  y tiene la orientación del asa  $\Omega$  característica de la subclasificación A2 y es resistente a otro tipo de antibióticos: los aminoglucósidos. Jin y su equipo evaluaron el efecto de inhibición del avibactam. Las constantes de inhibición que se reportaron frente a avibactam, ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam fueron de  $1.71 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ,  $0.41 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ,  $0.14 \pm 0.01 \mu\text{M}$  y  $0.57 \pm 0.07 \mu\text{M}$  respectivamente, sugiriendo que el inhibidor avibactam es el menos eficaz de los mencionados. El avibactam, al igual que los inhibidores clásicos se une a la enzima mediante la serina catalítica y hace contactos con la Ser 130 y 237, el grupo sulfato del avibactam forma contactos polares con la Ser 130, Ser 237 y con Thr 235. También forma contactos hidrofóbicos con el Trp 105 (Fig. 12). Estos contactos, son la razón por la que se cree que el avibactam es un inhibidor eficaz con las  $\beta$ -lactamasas de clase A y que el grupo sulfato es un factor clave para la inhibición (Jin *et al.*, 2017).

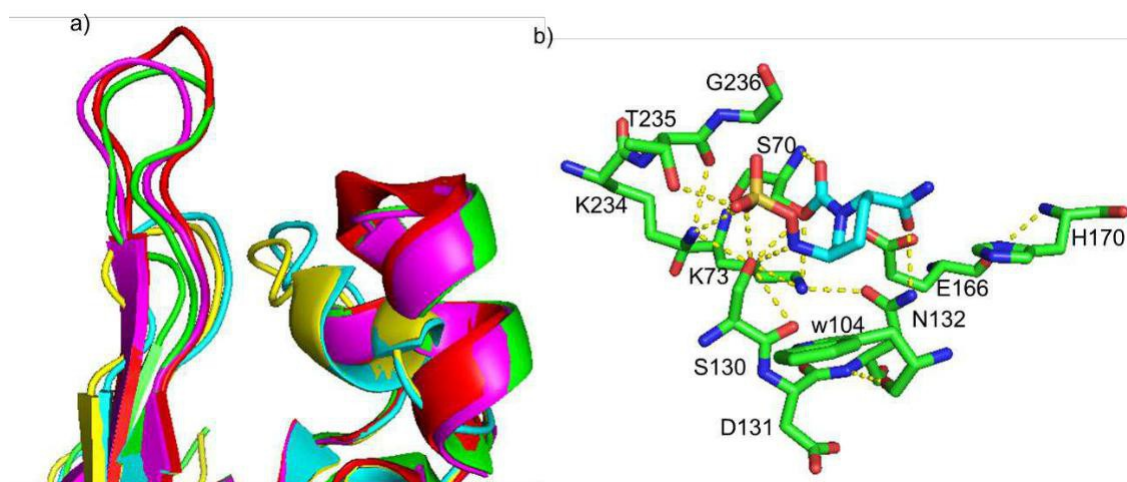


Figura 12. a) Comparación del asa  $\Omega$  y la inserción entre  $\beta 3$  y  $\beta 4$  de Toho-1 (amarillo), TEM-1 (cyan), PER-1 (verde), PER-2 (magenta) y TLA-3 (rojo). b) Puentes de hidrogeno (línea punteada) entre TLA-3 (verde) con avibactam (cyan). Modificado de Jin, 2017.

En este mismo año, Ruggiero y colaboradores, reportaron que mutaciones en Arg 220Gly de PER-2 volvía a la enzima menos susceptible a la inhibición por ácido clavulánico y por tazobactam; a su vez esta mutación redujo la eficiencia catalítica de la enzima con antibióticos como ampicilina y cefalotina. El cambio de un

aminoácido de carga positiva como la arginina rompe un puente de hidrógeno que la conecta con Thr 237 y una molécula de agua. Esta mutación a pesar de afectar la actividad de la enzima no modificó su conformación ni estructura, Ruggiero y equipo sugieren que la estabilidad del complejo enzima-inhibidor, es debido a la existencia de una red de puentes de hidrógeno entre la Ser 70, Gln 69, una molécula de agua, Thr 237 y la Arg 220 y que cualquier alteración en esta red como en la Arg220 tendrán un impacto en la susceptibilidad a la inactivación (Ruggiero *et al.*, 2017).

Varios investigadores del Departamento de Bioquímica, de Case Western Reserve University, liderados por el Dr. Focco van den Akker trabajan desde el 2003 con los **mecanismos de inhibición de distintas  $\beta$ -lactamasas** de clase A, entre ellas SHV-1. Con la técnica de espectrometría de Raman encontraron que los inhibidores al interactuar con la enzima pueden formar complejos cis-enamina o trans-enamina **con las  $\beta$ -lactamasas**, estas últimas son las más estables y las que se forman en mayor cantidad en los tres inhibidores clásicos (Ke *et al.*, 2012; Winkler *et al.*, 2013; Krishnan *et al.*, 2015; Padayatti *et al.*, 2005; Helfand *et al.*, 2007). Contario al ácido clavulánico y sulbactam, el tazobactam forma predominantemente intermediarios trans-enamina, debido a la presencia del grupo triazol que provee de interacciones polares e hidrofóbicas para interactuar con la enzima explicando porque tiene una mayor eficacia. En el 2009, los mismos autores, compararon la inhibición de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 contra dos variantes con el fenotipo BLEE; la SHV-2 y SHV-5 y encontraron que las variantes BLEE forman mayor cantidad de intermediarios trans-enamina, en lugar de cis-enamina, los cuales son más fáciles de hidrolizar. Con base en lo anterior, el equipo de Akker sugieren el diseño de nuevos inhibidores con diferentes grupos sustituyentes en el C2, que tengan el mismo efecto que el anillo triazol del tazobactam y que tengan la habilidad de formar trans-enaminas estables (Kalp *et al.*, 2009).

## TLA-1

Para este trabajo se utilizó la BLEE TLA-1, caracterizada en el 2000 por Silva y colaboradores (Fig. 13). Esta enzima, encontrada únicamente en pacientes en México, se caracteriza por hidrolizar cefotaxima, tiene un  $pI$  de 9 y un peso molecular de 31.4 kDa. El plásmido en el cual se encuentra la secuencia que codifica para esta proteína es de 150 kpb fue llamado RZA92 y transfiere resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos como la kanamicina, la tetraciclina, la estreptomina y el cloranfenicol. La BLEE TLA-1 se identificó como una  $\beta$ -lactamasa de clase A, según la clasificación de Ambler, ya que tiene los cuatro elementos conservados: Ser 70-X-X-Lys 73, Ser 130-Asp 131-Asn 132, el Glu **166 en el asa  $\Omega$  y el Lys 234-Thr 235-Gly 236**. También se realizaron experimentos cinéticos con TLA-1 en **presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos**, y se encontró que tiene una mayor eficiencia catalítica relativa con la cefalotina, seguido por cefotaxima y bencilpenicilina; y fue inhibida más fuertemente por tazobactam que por ácido clavulánico o sulbactam. Las actividades hidrolíticas fueron similares a la de CME-1 y VEB-1 (Silva *et al.*, 2000).

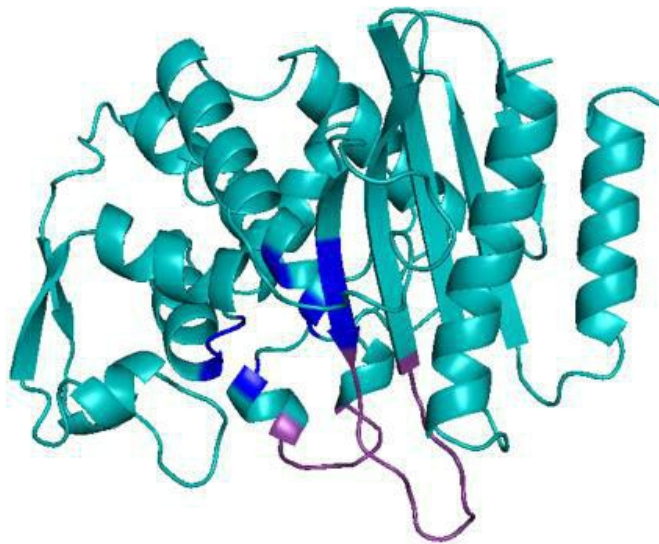


Figura 13. Estructura tridimensional de TLA-1. En azul rey se muestra el sitio catalítico y en morado la inserción **entre las láminas  $\beta 3$  y  $\beta 3$  y el asa  $\Omega$** .

En nuestro laboratorio se sobre expresó, purificó, cristalizó y se obtuvo la estructura cristalográfica de la BLEE TLA-1 silvestre y en complejo con ácido clavulánico, donde se pudo observar que esta enzima estaba unida covalentemente a dos moléculas de ácido clavulánico en la Ser 237 y en la Ser 70 (Fig. 14). Cabe destacar que la Ser 237 **no había sido reportada con actividad catalítica en ningún tipo de  $\beta$ -lactamasa**, ni ninguna otra serina además de la 70, es decir es la primera  $\beta$ -lactamasa con dos serinas catalíticamente activas. El intermediario no mostró ninguna interacción polar con ningún residuo, mientras que la molécula de ácido clavulánico unida covalentemente a la Ser 237 interacciona con la Ser 70 mediante un puente de hidrógeno (Fig. 15). La poca cantidad de interacciones polares que establece el ácido clavulánico con la enzima, y el hecho de que se necesiten dos moléculas para inhibir a una enzima, podrían ser las razones de su baja eficacia como inhibidor (Cifuentes *et al.*, 2019).

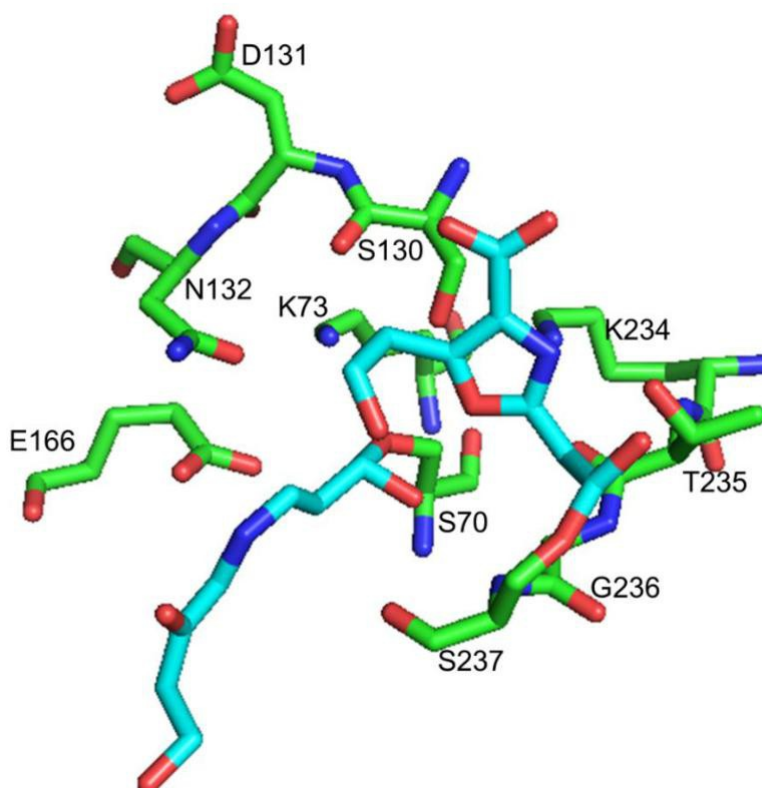


Figura 14. Sitio Activo de TLA-1 con una molécula de ácido clavulánico unido a la Ser 237 y una molécula de un intermediario de ácido clavulánico unido covalentemente a la Ser 70. Modificado de Cifuentes, 2019.

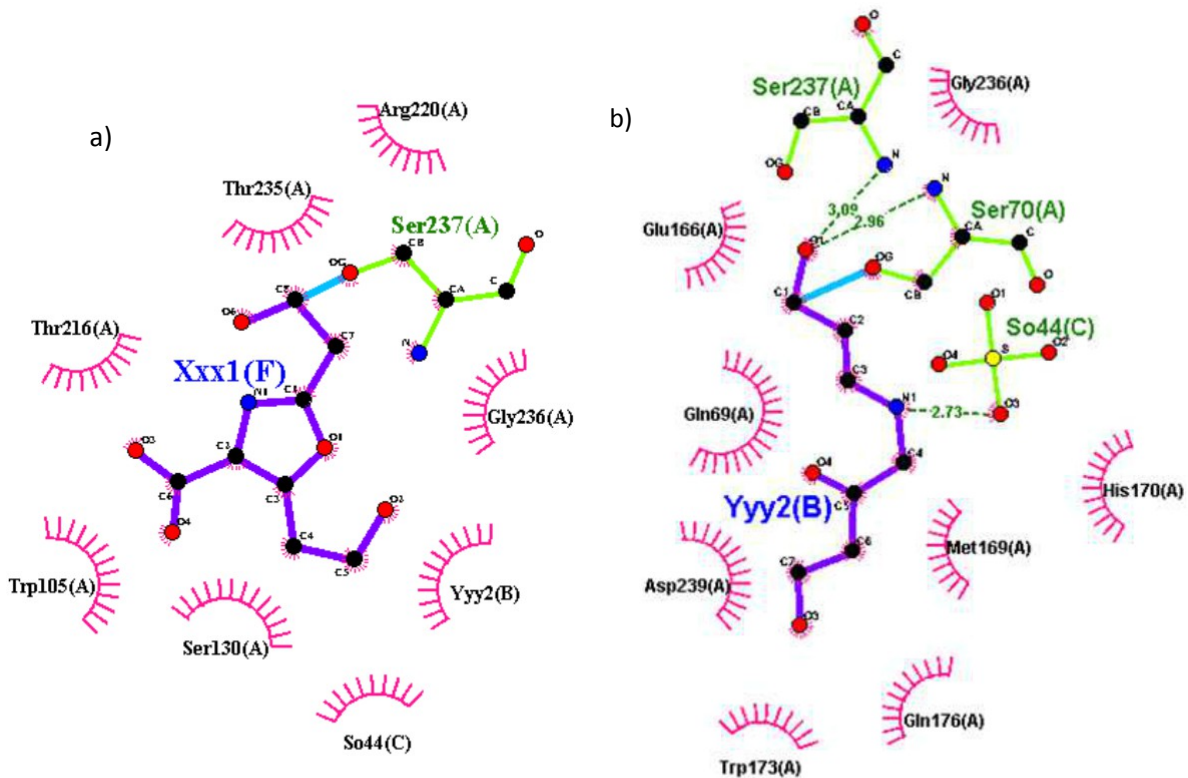


Figura 15. Unión de ácido clavulánico con TLA-1 a) Ácido clavulánico (morado) intacto unido covalentemente (cian) a la Ser 237(verde) b) Intermediario del ácido clavulánico (morado) unido covalentemente (cian) con Ser 70 (verde) y mediante puentes de hidrógeno (rosa) con Ser 237, Ser 70 y un sulfato (amarillo) contactos hidrofóbicos (rosa). Realizados con el programa LigPlot+.

Posteriormente en nuestro laboratorio se construyó una mutante de TLA-1 con la Ser 70 mutada a Gly. Posteriormente se realizaron pruebas de actividad con nitrocefina, **un antibiótico  $\beta$ -lactámico** que cambia de coloración al hidrolizarse el **anillo  $\beta$ -lactámico**, donde los autores obtuvieron actividades residuales para la mutante de  $0.235 \pm 0.007 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  en comparación con la cepa silvestre de  $1082.87 \pm 0.006 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . También se determinó la estructura cristalográfica de la enzima mutante en complejo con ácido clavulánico, pero no se encontró el inhibidor en el sitio activo, lo que podría denotar la baja afinidad del ácido clavulánico por la Ser 237 (Cifuentes *et al.*, 2019)

TLA-1 es de las BLEE más detectadas en el país en pacientes hospitalizados al igual que CTX-M-15 y SHV-12 en *K. pneumonia*, *E. coli* y *E. cloacae* (Uc-cachón *et al.*, 2019). El gen que codifica para TLA-1 se ha encontrado en un 11% de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE en México (Alcantar *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2011). Incluso hay reportes de que entre varios



genes el que codifica para TLA-1 se encuentra presente en aguas residuales en Nebraska (Agga *et al.*, 2015). Esta BLEE, al presentar resistencia a ser inhibida y presentarse con frecuencia en caso clínicos dentro del país, la hace de suma relevancia su estudio estructural en complejo con antibióticos e inhibidores, para entender sus mecanismos catalítico e inhibitorio y generar información básica para el desarrollo de fármacos eficaces contra bacterias productoras de TLA-1.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente y alarmante resistencia bacteriana a antibióticos  $\beta$ -lactámicos se considera prioridad la investigación, así como el desarrollo de nuevos antibióticos que no sean hidrolizados por las bacterias resistentes. El estudio de las  $\beta$ -lactamasas fue de gran ayuda para; el desarrollo de la 3ra y 4ta generación de antibióticos, la producción de antibióticos en complejo con inhibidores que evitara la hidrólisis del antibiótico y conocer los residuos conservados que participan en la catálisis. Un mejor entendimiento de la interacción que tienen con los antibióticos y con los inhibidores, mediante estudios estructurales nos permitirá seguir un paso adelante para la contención de bacterias resistentes y la prevención de distintas **enfermedades**. La  $\beta$ -lactamasa TLA-1 ha aumentado su prevalencia en microorganismos en nuestro país, lo que la hace de gran interés en el área médica, además tiene constantes de inhibición más altas que otras enzimas reportadas, necesitando aumentar la dosis de inhibidores administradas a pacientes, lo cual tiene implicaciones económicas, debido al alto costo de los inhibidores, efectos secundarios en la salud de los pacientes y el uso excesivo de los inhibidores, a falta de otro tratamiento, contribuye al desarrollo de la resistencia hacia los mismos. El hecho de tener una segunda serina catalítica hace de suma importancia el seguimiento en la investigación de esta enzima, ya que cambia el mecanismo de inhibición propuesto y el entendimiento que teníamos del mismo, una segunda serina catalítica explica por qué se necesita una mayor cantidad de inhibidores para inactivar a TLA-1. La información confirmada en esta tesis relativa a que TLA-1 tiene dos serinas catalíticas tendrá que ser considerado por aquellos que diseñen y desarrollen inhibidores que bloqueen ambos residuos catalíticos para una mayor eficacia terapéutica.

## **HIPÓTESIS**

Se obtendrá el complejo acil-enzima con el sulbactam unido covalentemente a la Ser 237 de la mutante TLA-1 S70G.

## **OBJETIVO GENERAL**

Comprobar la actividad catalítica de la Ser 237 de TLA-1 S70G de *E. coli* en complejo con sulbactam.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Expresar y purificar TLA-1 S70G
- Cristalizar TLA-1 S70G en unión con sulbactam
- Determinar estructura de TLA-1 S70G en complejo con el inhibidor
- Analizar estructuras generadas

## METODOLOGÍA

### Transformación

Se realizó la transformación bacteriana usando electroporación a 1.6 V con 0.7  $\mu$ l del plásmido pJ411 en la cepa de *E. coli* BL21. Se seleccionaron por supervivencia en presencia de 30  $\mu$ g/ml de kanamicina. El plásmido fue proporcionado por la compañía ATUM (Newark, California).

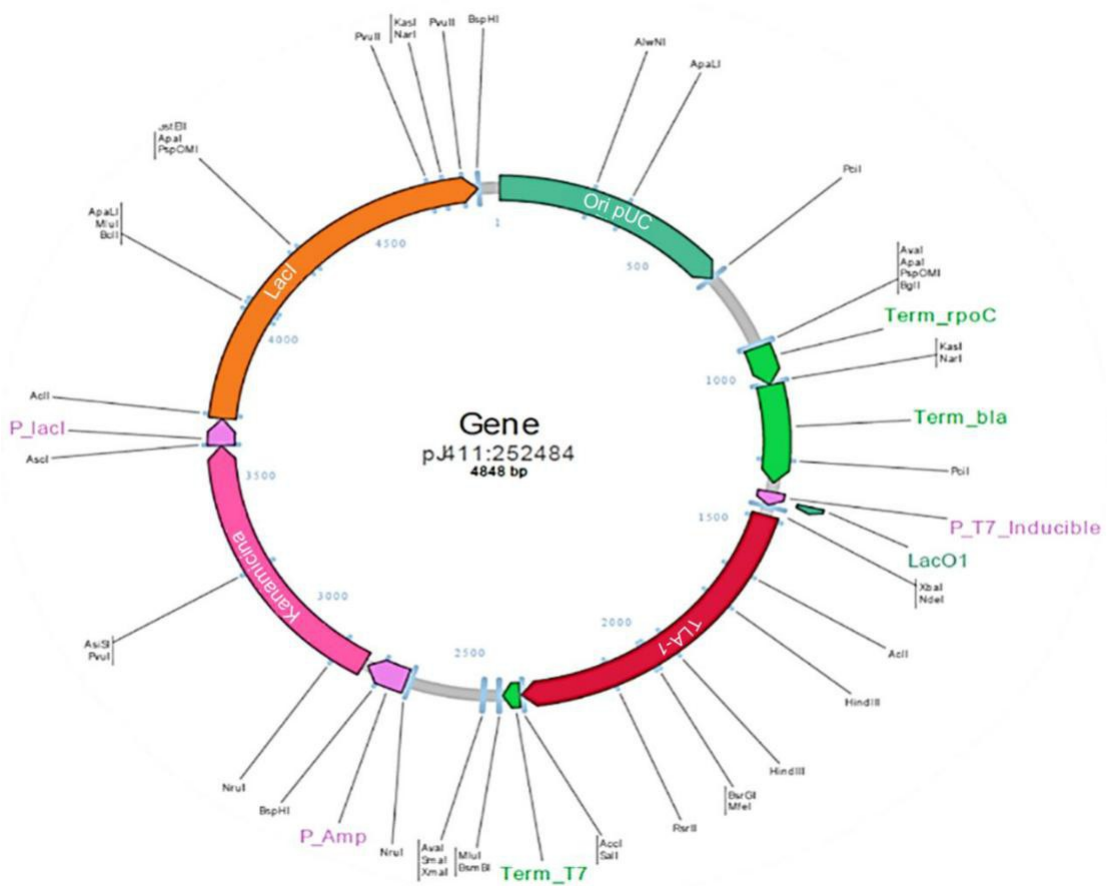


Figura 16. Diagrama del plásmido pJ411 con el gen que codifica para TLA-1

### Expresión

Se preparó un preinóculo en un matraz con 30ml de medio Luria Bertani (LB) y 30  $\mu$ g/ml de kanamicina inoculando con un glicerol de la cepa transformada, se dejó crecer 16 hrs a 37°C con una agitación de 200 rpm. Pasado el tiempo se inocularon

500 ml de medio LB y 30 µg/ml de kanamicina en una relación 50:1000 con el pre inóculo, se dejó crecer a 37°C con 250 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica a 600nm de 0.6 y una vez alcanzada la densidad óptica se indujo la sobreexpresión de la proteína con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 0.5mM y se dejó incubando por 48hrs a 18°C y 250rpm

### **Lisis celular**

Para la ruptura se centrifugó el medio a 4,600 rpm y 4°C por 40 min en un rotor JA10, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces la pastilla obtenida con amortiguador de lisis compuesto de 30mM de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)-HCl, 50mM de NaCl a pH 8.

Se lisaron las células mediante sonicación a 30% de amplitud se hicieron 15 ciclos de 20 s de sonicación y 1min de descanso. Una vez lisadas las células se centrifugaron a 17,000 rpm por 50 min a 4°C en un rotor JA 20.

### **Purificación**

El sobrenadante de la lisis celular se dializó contra 500 ml del amortiguador ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) 50 mM pH 6.4. La proteína se purificó por cromatografía de intercambio catiónico utilizando la resina de CM sefrosa equilibrada con el mismo amortiguador. La proteína se eluyó de la resina mediante la aplicación de un gradiente de NaCl de 0.05 M a 1 M y se evaluó su purificación por gel desnaturante SDS-PAGE (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) al 12% y se identificó mediante una prueba de actividad.

### **Prueba de actividad**

Se utilizó un método cualitativo mediante la hidrólisis de nitrocefina, a 1 mM, una cefalosporina cromógena, que sin hidrolizar presenta un color amarillo con un

máximo de absorción a **386 nm**, pero en presencia de  **$\beta$ -lactamasas** el anillo  **$\beta$ -lactámico** es hidrolizado y cambia a una coloración roja con un máximo de absorción a 482nm.

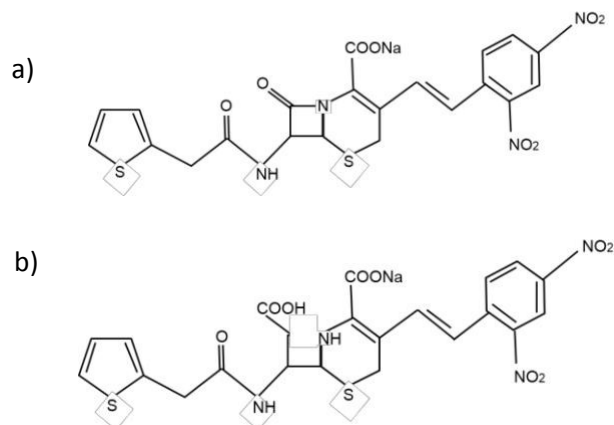


Figura 17. Formula estructural desarrollada del antibiótico nitrocefina. a) anillo  $\beta$ -lactámico intacto. b) anillo  $\beta$ -lactámico hidrolizado.

## Concentración

Para concentrar la proteína a 10 mg/ml se usaron tubos Amicon (*Merck*) de corte 10 KDa, estos centrifugaron por 50 min a 4°C y 4600 rpm. Para la cuantificación se utilizó el equipo NanoDrop (*Thermo Scientific*) y el coeficiente de extinción molar calculado con la herramienta de *ExpASy*.

## Cristalización

Para cristalizar la proteína se utilizó el método de difusión de vapor de gota sedente que consiste en colocar en un pocillo una cantidad del agente precipitante y en una elevación del pocillo una mezcla del mismo volumen de proteína y de agente precipitante en una gota. Como la solución del pocillo está a menor concentración que la de la gota causa una difusión de vapor de la gota al pocillo. La evaporación de la gota hace que las concentraciones de la proteína y del agente precipitante aumenten, formando en algunos casos cristales (Fig. 14).

La condición de cristalización de esta proteína consta de 2.2 M de sulfato de amonio, 100m M de fosfato de sodio dibásico y ácido cítrico a pH 4.5, misma ya utilizada en el laboratorio.

Con el fin de obtener la estructura cristalografía de TLA-1 en complejo con los inhibidores tazobactam y sulbactam se remojaron los cristales de la proteína en soluciones super saturadas de sulbactam para posteriormente sobre enfriar con nitrógeno líquido a 77.3 K.

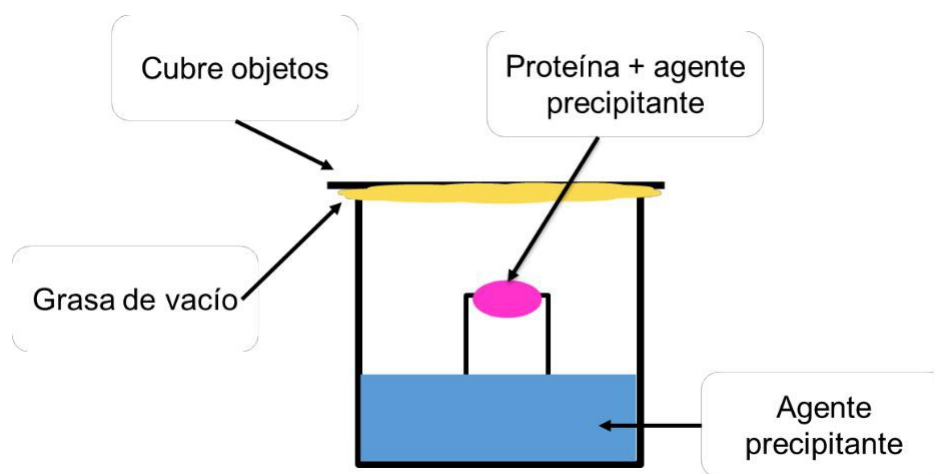


Figura 18. Diagrama de un pozo en una placa para poner pruebas de cristalización por el método difusión de vapor por de gota sentada.

### Determinación y análisis de la estructura

Para determinar la estructura de la proteína en complejo con los inhibidores se utilizó una variante de la técnica de reemplazo molecular, ya que en trabajos anteriores en nuestro laboratorio se obtuvo la estructura de TLA-1 S70G. Se hizo una sustitución molecular que fue determinada y analizada mediante los programas *Mosflm*, *XDS*, *CCP4 XDS*, *Coot*, *Phenix*, *Pymol* y *Ligplot* (Battye *et al*, 2011; Emsley *et al.*, 2010; Kabsch *et al* 2010 Laskowski *et al.*, 2011; Watkins *et al.*, 2013; Winn *et al*, 2011; Wlodawer *et al.*, 2013).

Los patrones de difracción fueron analizados con el programa *ipMosflm*, así como el indexado de las reflexiones y sus intensidades para obtener los parámetros de celda basándose en las posiciones de las reflexiones. Cada reflexión se caracteriza



por su amplitud y fase, sin embargo, solo las amplitudes se obtienen de las intensidades medidas, por lo que no hay información directa de las fases en el experimento de difracción. Después del indexado se realizó la integración de las reflexiones para determinar posibles grupos espaciales (Winn *et al.*, 2011)

El programa *Pointless* de *CCP4* busca características en los patrones de difracción que cumplan con los posibles grupos Laue de acuerdo a los parámetros de celda, buscando simetría en las reflexiones. Si bien, no determina el grupo espacial *per se*, permite evaluar si el grupo y celda seleccionados en *ipMosflm* es correcta (Winn *et al.*, 2011).

El escalamiento de datos se realizó con el programa *Aimless* de *CCP4*, en donde se aplica un factor de escala en caso de que el cristal presente daño por radiación, que difracte anisotrópicamente o por variación en la mosaicidad del mismo. La mosaicidad se refiere a que tan homogéneo es el cristal (Winn *et al.*, 2011). Este programa también nos da los estadísticos para saber a qué resolución debemos cortar la estructura, valores como  $R_{\text{merge}}$ ,  $R_{\text{meas}}$   $CC_{1/2}$ ,  $I/\sigma$ , **multiplicidad y completitud**.  $R_{\text{merge}}$  es un indicador global que muestra la correlación entre las amplitudes observadas y las calculadas, es decir que tanto coincide el modelo con los datos colectados.  $R_{\text{meas}}$  mide lo mismo que  $R_{\text{merge}}$  pero tomando en cuenta la multiplicidad; usualmente para estos estadísticos se buscan valores menores al 15% entre 3% y 5% (Diederichs *et al.*, 1997; Meroueh *et al.*, 2002; Wlodawer *et al.*, 2013).  $CC_{1/2}$  es el coeficiente de correlación entre dos mitades de un *data set* y hay mucha variación en lo que se consideran valores aceptables de este parámetro desde arriba del 30% hasta no mayor del 80% (Karplus *et al.*, 2012).  $I/\sigma(I)$  es las veces que la intensidad de una reflexión vale sobre lo que se determinó como ruido de esa misma reflexión o grupo de reflexiones; para este parámetro se busca un mínimo de 2 para poder asegurar que lo que se mide no es ruido (Karplus *et al.*, 2012; Wlodawer *et al.*, 2013). La multiplicidad o redundancia son las veces que se mide una sola reflexión; a mayor multiplicidad mayor precisión en la estimación de la intensidad de dichas reflexiones (Wlodawer *et al.*, 2013). La completitud o integridad de los datos es la cobertura de todas las posibles reflexiones colectadas en un *data set* con relación

a la celda, la resolución máxima y el grupo espacial del arreglo cristalino; al igual que la multiplicidad se busca que tengan valores cercanos al 100% (Wlodawer *et al.*, 2013).

Para realizar todo lo anterior también se puede utilizar *XDS*, que es una suite de programas con la que también se puede hacer el proceso de indexado, integrado y escalado de los datos. El patrón de difracción y los parámetros de colecta se usan en el programa *XDS* y éste genera una lista de intensidades integradas de las reflexiones de cada imagen y sugiere el grupo espacial, así como la resolución máxima; posteriormente el archivo de reflexiones generado, “*XDS\_ASCII.HKL*” se emplea para alimentar al programa *XSCALE*, el cual realiza un escalamiento de datos, combina las reflexiones de varias imágenes en un solo data set y reporta una multitud de parámetros que permiten al usuario decidir con respecto a diversos valores como la calidad de los datos y la resolución de los mismos. Por último, el archivo de reflexiones generado, con terminación “.*ahkl*”, se cambia de formato con *XDSCONV* para poder continuar el proceso utilizando las herramientas implementadas en *CCP4* y descritas en el párrafo anterior (Kabsch *et al.*, 2010).

Para resolver el problema de fases se utilizó el programa *Phaser* en su versión implementada en *CCP4*, que utiliza la técnica de reemplazo molecular. Esta técnica a grandes rasgos consiste en utilizar un modelo o las coordenadas de una proteína parecida a la cristalizada, e intentar reconstruir el patrón de difracción de la proteína de interés, en particular con respecto sus amplitudes e intensidades, de cada reflexión medida, lo anterior, mediante la rototraslación del modelo de búsqueda tanto en espacio real como recíproco (Winn *et al.*, 2011).

Mediante el programa *Refmac* se realizó un afinamiento de cuerpo rígido y se generó el mapa de densidad electrónica, que representa a la distribución de electrones dentro de la red cristalina, para ajustar el modelo y a su vez generar un grupo de reflexiones construidas a partir del modelo y compararlas con los datos experimentales medidos tras la difracción del cristal. El mapa de densidad electrónica se generó calculando las series de Fourier del set de amplitudes

, donde  $x, y, z$  son las coordenadas

$$\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|^2 - \sum_{hkl} |F_{calc}(hkl)|^2 = \chi^2$$

observadas y sus fases. El programa utiliza la ecuación

espaciales

en espacio real y  $hkl$  son los índices de Miller, es decir los planos cristalinos en el espacio recíproco (Winn *et al*, 2011).

A partir de este punto se hacen una cantidad determinada de afinamientos con el programa *Phenix*, variando los parámetros del modelo generado en *Refmac*, en específico las coordenadas, los valores B y la ocupación de cada átomo, para lograr la mejor correlación entre las amplitudes observadas ( $F_{obs}$ ) y las calculadas a partir del modelo ( $F_{calc}$ ). Esta correlación es medida por el valor llamado R-factor, el cual en teoría y en un modelo perfecto daría valores de 0, pero como más del 45% del cristal es solvente, estos valores rara vez bajan tanto (Winn *et al*, 2011) (Liebschner *et al*, 2019). En cada afinamiento la estructura y su mapa de densidad electrónica se visualizan con el programa *COOT* (Emsley *et al.*, 2010).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Expresión y Lisis Celular

Una vez lograda la transformación se procedió a la expresión de la proteína siguiendo la metodología previamente descrita. En la figura 19 se pueden observar una banda entre 36 y 28 kDa, la cual corresponde a la proteína TLA-1 con un peso de 31.4. En el carril de la muestra antes de ser inducida se logra detectar una banda que, por peso, corresponde a TLA-1, esto debido posiblemente a que la cepa de *E.coli* BL21 (DE3) fue transformada con un vector que posee el operón Lac y éste en ausencia de IPTG puede llegar a presentar una expresión basal.

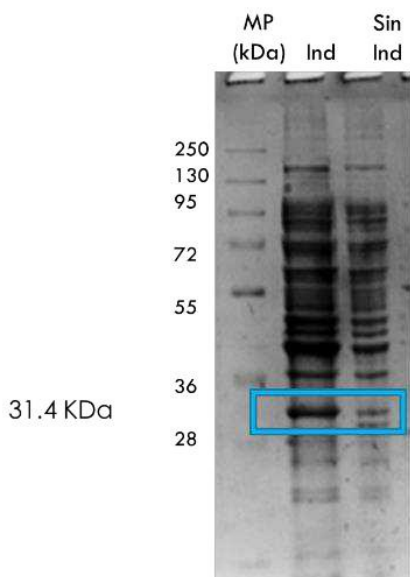


Figura 19. SDS-PAGE al 12%, donde se observa la expresión de una proteína y el control negativo, el cual es el producto de la lisis de *E.coli* BL21 (DE3) sin inducir. Sin Ind representa el carril de la cepa antes de inducirse. Ind es la cepa después de las 48 hrs de haber sido inducida tal como fue reportado por Cifuentes, 2019.

### Purificación y Concentración del TLA-1 S70G

Mediante un gel electroforesis SDS-PAGE al 12% se pudo determinar que una proteína con el peso de TLA-1 se encontraba en las fracciones 19-27 correspondiendo a una concentración de elusión de NaCl de 150 mM aproximadamente. Se excluyeron las muestras 24 y 27 al presentar una contaminación evidente (Fig. 20).

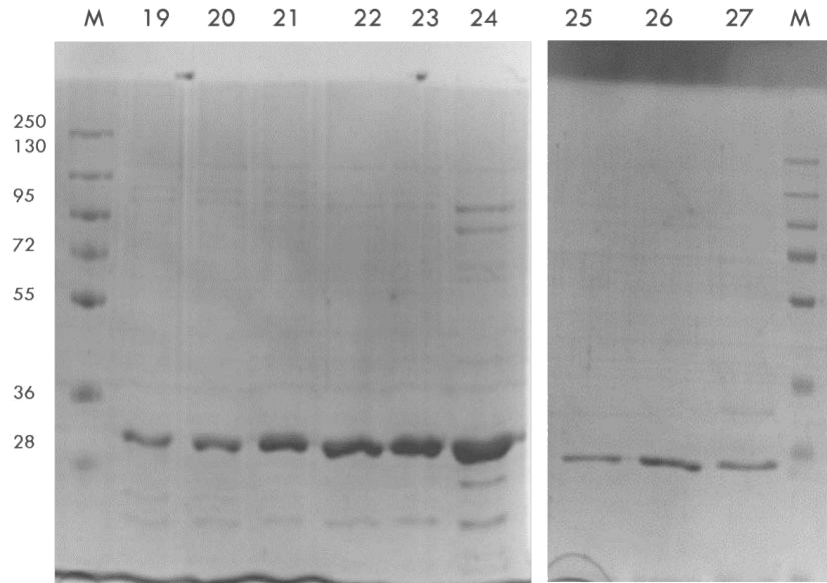


Figura 20. Purificación de TLA-1 S70G. SDS-PAGE al 12% mostrando distintas fracciones de la purificación con la columna CM-sefarosa, donde M corresponde al marcador de peso molecular y cada carril es una fracción recolectada por el proceso de purificación descrito en el texto.

Posterior a la purificación de TLA-1 **S70G**, se realizó una prueba de actividad de  $\beta$ -lactamasa con la nitrocefina, la cual presentó una coloración naranja, probando cualitativamente la presencia de una  $\beta$ -lactamasa. Como control negativo se usó nitrocefina con el *buffer* MES a 50 mM pH 6.4 (Fig. 21a). La proteína se concentró hasta una concentración aproximada de 10 mg/ml en aproximadamente 250  $\mu$ l de solución (Fig. 21b).

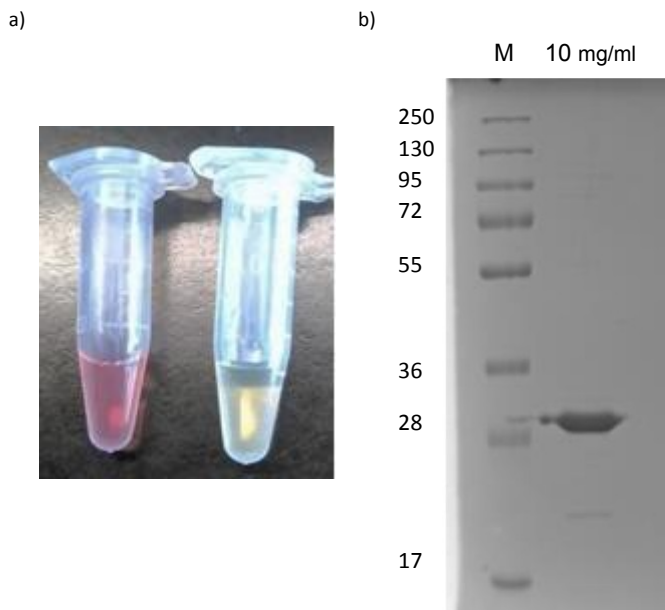


Figura 21. a) Resultado cualitativo de la prueba de actividad; en el tubo de la izquierda se observa la muestra con la  $\beta$ -lactamasa purificada (rojo) y en el de la derecha la prueba únicamente con MES (transparente). b) concentración de TLA-1 S70G. SDS-PAGE al 12% donde M corresponde al marcador de peso molecular y el siguiente carril muestra a la proteína concentrada a 10

## **Cristalización de TLA-1 S70G.**

La cristalización se realizó a 18° C con el método de difusión de vapor de gota sedente, el mismo utilizado para la variante silvestre, con 4µl de proteína a 10 mg/ml y 4µl de la condición de cristalización en la gota, y 1 ml de la condición en el reservorio. Se obtuvieron cristales a diferentes concentraciones de sulfato de amonio (Fig. 22) y se escogieron cristales en 2.2 y 2.4 M de sulfato de amonio para exponerlos a los rayos X.

Con el fin de crio preservar y difundir sulbactam en los cristales, se realizó el remojo de los mismos en la solución con los inhibidores el mismo día en que se sobre enfriaron. Se preparó una solución saturada de cada inhibidor por separado y en las condiciones en que aparecieron los cristales, cada cristal se remojó entre 2-3 min y se sobre enfrió inmediatamente en nitrógeno líquido. No se usó solución crio preservadora adicional debido a la alta concentración de sulfato de amonio en la condición.

Posteriormente se obtuvieron cristales de la proteína silvestre en las mismas condiciones. No estuvieron listos para cuando se tenía tiempo asignado en el sincrotrón APS, por lo que se expusieron a la radiación en el LANEM del Instituto de Química de la UNAM, donde se cuenta con un equipo de ánodo rotatorio. Sin embargo, no difractaron a una resolución mayor a 3 Å, por lo que se decidió no coleccionar datos.

Los cristales de la mutante S70G se difractaron en la línea 19BM del APS en Chicago. Los dos cristales que crecieron a 2.4 M de sulfato de amonio no se coleccionaron al ser muy evidente en el patrón de difracción que eran cristales múltiples y los dos que crecieron en 2.2 M sí se coleccionaron. Su tiempo de remojo, con la solución saturada de sulbactam fue de 2:15 y 3:15 min respectivamente. Ambos cristales difractaron a 2.2 Å de resolución, pero durante la etapa de afinamiento se decidió seguir trabajando únicamente con el cristal cuyo tiempo de remojo fue de 3:15. Lo anterior atendió a que en la estructura cristalina remojada por 2:15 min, el sitio activo se observaba vacío, lo que nos indica que el tiempo de remojo es determinante para ver al inhibidor en el sitio activo.

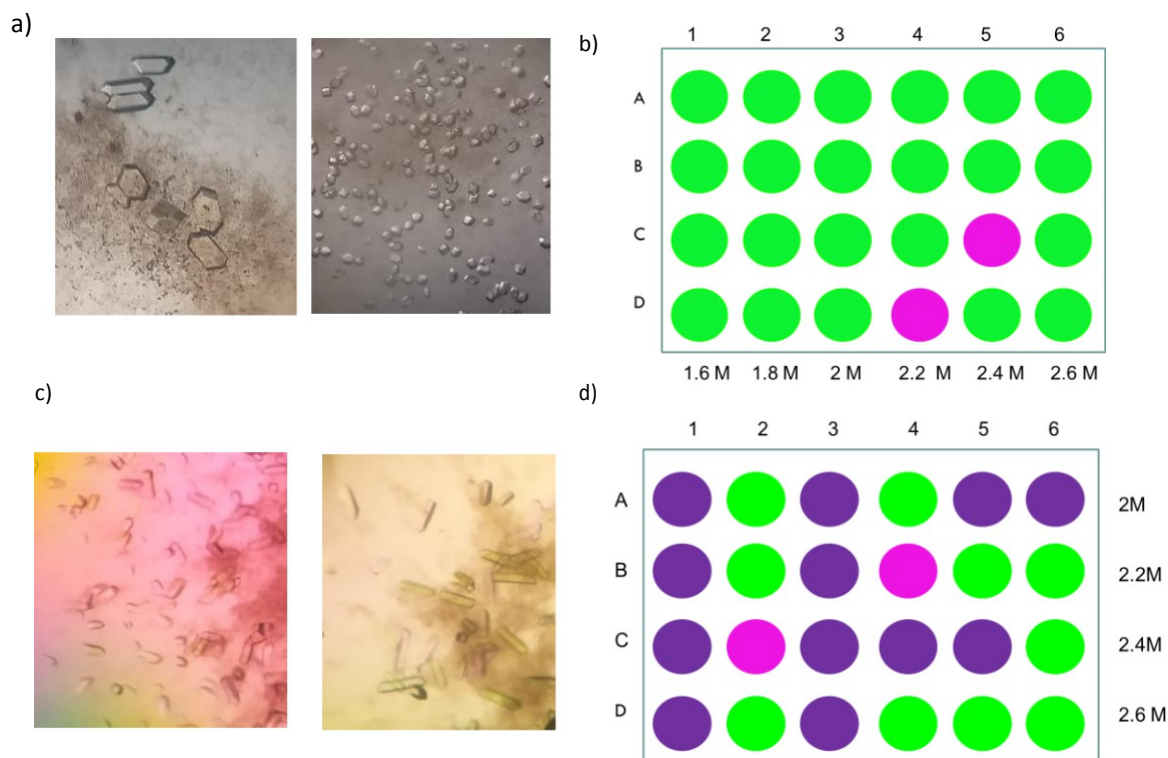


Figura 22. a) Cristales obtenidos de TLA-1 S70G b) Diagrama de la condición de cristalización en rosa se marcan las condiciones de donde se tomaron los cristales que se mandaron a difractar, en verde donde crecieron cristales y en morado donde no. c) Cristales obtenidos de TLA-1 silvestre. d) Diagrama de condición de cristalización.

### Determinación y análisis de la estructura.

Se determinaron dos estructuras cristalográficas en presencia de una solución saturada de Sulbactam, y con dos tiempos de remojo distintos: 2:15 y 3:15 min. En la estructura cristalográfica de menor tiempo de remojo, en el sitio activo se encontró una molécula de TRIS a una resolución de 2.1Å, mientras que en la estructura del cristal que fue remojo durante 3:15 min. se encontró el intermediario trans-enamina del sulbactam a una resolución de 2.25 Å.

Después de indexar y reducir datos con *ipMosflm*, las fases de ambas estructuras se determinaron por Reemplazo Molecular utilizando *Phaser* y las coordenadas de TLA-1 (PDB 6NVT), y posteriormente fueron afinadas con *Refmac 5* de *CCP4* y *Phenix* dando valores de  $R_{work}$  y  $R_{free}$  de 0.205 y 0.252 para la estructura con menor tiempo de remojo. Sin embargo, los valores de  $R_{work}$  y  $R_{free}$  de la estructura con

mayor tiempo de remojado en proceso de afinamiento eran muy altos, y la inspección cuidadosa de los modelos y mapas de densidad con *Coot*, no evidenciaban ningún problema que explicara el comportamiento de los valores  $R_{work}$  y  $R_{free}$ , se decidió utilizar la suite *XDS* para rehacer el indexado de los datos, la asignación del grupo espacial, el análisis de las reflexiones y el escalado. Si bien, se usaron las coordenadas preliminares, descritas al inicio de este párrafo para el remplazo molecular. El grupo espacial obtenido en ambas metodologías fue  $P 4_1 2_1 2$  que corresponde a una celda tetragonal, como previamente se había descrito para la estructura cristalográfica de TLA-1 en complejo con Ácido Clavulánico (PDB 6NVU). Esta segunda metodología de tratamiento de los datos, usando *XDS*, dio lugar a valores  $R_{work}$  y  $R_{free}$  de afinamiento de 0.216 y 0.255 para la estructura, congruentes con la resolución de la estructura y con un cristal con una alta cantidad de solvente, como lo es este. Un análisis más cuidadoso de la razón del éxito de *XDS* frente a *ipMosflm*, se basa en que el patrón de difracción que dio lugar a esta estructura cristalográfica, tiene al menos dos matrices de dos cristales distintos superpuestos visibles a simple vista, y en este caso *XDS* fue capaz de separarlas y quedarnos con los datos de la matriz con intensidades mayores, mientras que *ipMosflm* combinaba las reflexiones provenientes de al menos dos redes cristalográficas, es decir de al menos dos cristales diferentes.

Las estructuras cristalográficas obtenidas de TLA-1 S70G con TRIS en el sitio activo y en complejo con sulbactam tiene una resolución máxima de 2.10 Å y 2.25 Å respectivamente, Es importante resaltar que se decidió usar como criterio de resolución máxima a los **valores de CC  $\frac{1}{2}$  (0.85 en la última faja) e  $I/\sigma(I)$  (2 en la última faja)** (Tabla 1 y 2). En la figura 23 se observa una vista general de TLA-1 S70G con TRIS y con sulbactam, resaltando las características estructurales que hacen a TLA-1 **pertenecer a la subclase A2: la inserción entre la  $\beta 3$  y  $\beta 4$  y el acomodo diferente del asa  $\Omega$  en comparación con otras  $\beta$ -lactamasas de la clase A.** También se observa la sobreposición del sitio activo de ambos cristales de TLA-1 S70G (esta tesis) y con complejo TLA-1 con Ácido Clavulánico (Cifuentes *et al.*, 2019). Como se observa en la figura 23 la mutante S70G tiene el mismo acomodo, tanto de cadena principal como de cadenas laterales de los residuos que conforman



al sitio activo que TLA-1 silvestre, lo único que cambia son la naturaleza y posición de los ligandos, los cuales además son de un volumen similar, por lo que la estructura no tiene cambios conformaciones dependientes del inhibidor o de la mutación en el residuo 70

Tabla 1. Tabla cristalográfica de la estructura TLA-1 S70G con TRIS en el sitio activo

TLA-1 S70G TRIS	
Longitud de onda	0.97Å..
Rango de Resolución (Å)	70.4-2.1
Grupo espacial	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Parametros de celda (Å, °)	99.4 99.4 99.7 90 90 90
Reflexiones totales	574514 (38545)
Reflexiones únicas	29808 (1975)
Multiplicidad	19.2 (19.5)
Compleitud ( <i>Completeness</i> ) (%)	99.8 (99.9)
$I/\sigma(I)$	22.13 (2.97)
R <sub>merge</sub>	0.1122 (1.249)
R <sub>meas</sub>	0.1154 (1.283)
CC <sub>1/2</sub>	99.9 (80.3)
R <sub>work</sub>	0.205
R <sub>free</sub>	0.252
Número de átomos en la unidad asimétrica	2521
Número de residuos / número de átomos de proteína en la unidad asimétrica	267 / 2195
Número de átomos de ligandos en la unidad asimétrica	82
Número de moléculas de agua en la unidad asimétrica	244
RMS enlaces (Å)	0.008
RMS ángulos (°)	0.889
Ramachandran favorecidos (%)	95.99 %
Ramachandran permitidos (%)	4.01 %
Wilson B-factor (Å <sup>2</sup> )	35.43
PDA Promedio (Å <sup>2</sup> )	38.48
PDA proteína (Å <sup>2</sup> )	37.35
PDA ligandos (Å <sup>2</sup> )	58.45
PDA solvente (Å <sup>2</sup> )	41.98

Tabla 2. Tabla cristalográfica de la estructura TLA-1 S70G con el intermediario trans-enamina de sulbactam

TLA-1 S70G SB	
Longitud de onda	0.97Å.
Rango de Resolución (Å)	70.3-2.25
Grupo espacial	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Parametros de celda (Å, °)	99.2 99.2 99.6 90 90 90
Reflexiones totales	329774 (48210)
Reflexiones únicas	23567 (3414)
Multiplicidad	13.9 (14.12)
Compleitud ( <i>Completeness</i> ) (%)	98.2 (90.2)
I/σ(I)	19.73 (2.23)
R <sub>merge</sub>	0.1180 (1.359)
R <sub>meas</sub>	0.1210 (1.411)
CC <sub>1/2</sub>	99.9 (85.3)
R <sub>work</sub>	0.216
R <sub>free</sub>	0.255
Número de átomos en la unidad asimétrica	2412
Número de residuos / número de átomos de proteína en la unidad asimétrica	267 / 2195
Número de átomos de ligandos en la unidad asimétrica	86
Número de moléculas de agua en la unidad asimétrica	131
RMS enlaces (Å)	0.007
RMS ángulos (°)	0.914
Ramachandran favorecidos (%)	98.18
Ramachandran permitidos (%)	1.82
Wilson B-factor (Å <sup>2</sup> )	37.88
PDA Promedio (Å <sup>2</sup> )	42.87
PDA proteína (Å <sup>2</sup> )	41.78
PDA ligandos (Å <sup>2</sup> )	69.86
PDA solvente (Å <sup>2</sup> )	43.49

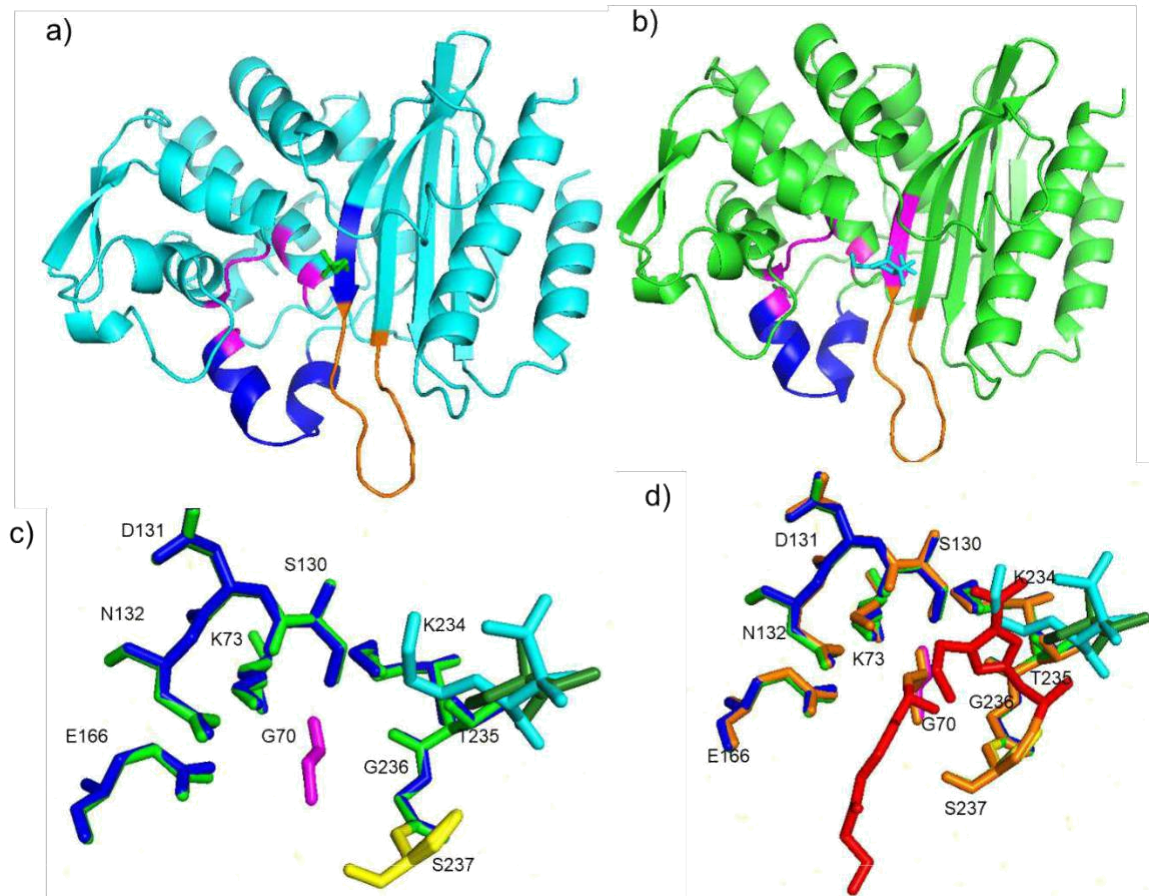
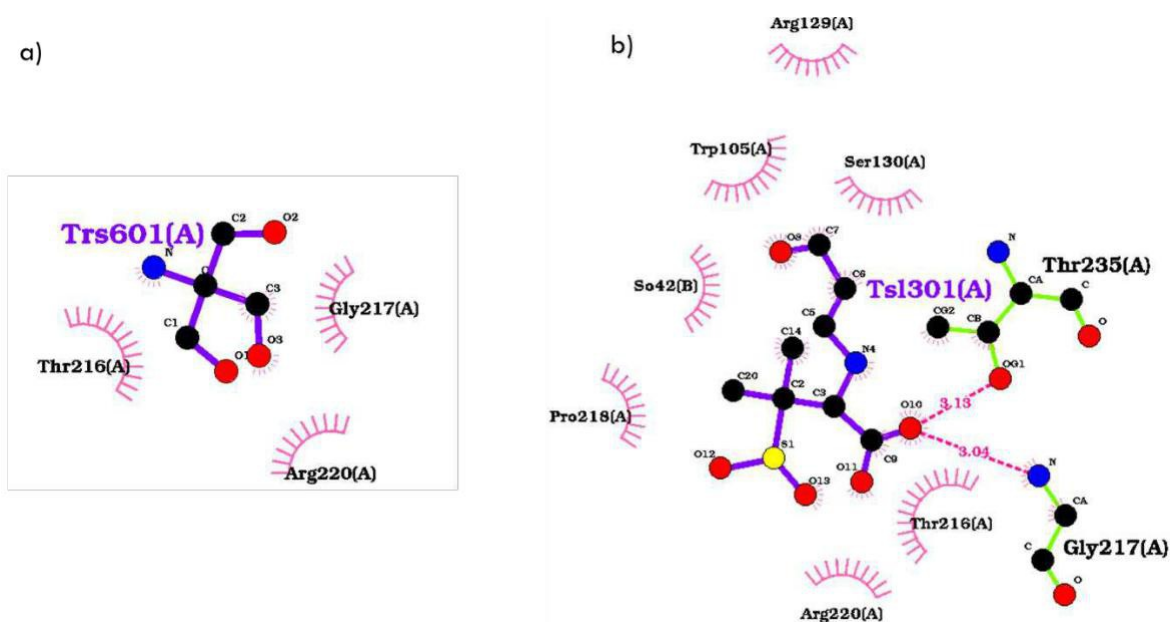


Figura 23. a) Estructura de TLA-1 S70G con TRIS, sitio activo en magenta, inserción en naranja, asa  $\Omega$  en azul y TRIS en verde b) Estructura de TLA-1 S70G con sulbactam, sitio activo en magenta, inserción en naranja, asa  $\Omega$  en azul y sulbactam en cian c) Sitio activo de ambos cristales de TLA-1 S70G superpuestos Ser 70 en magenta y 237 en amarillo d). Sitio activo de ambos cristales de TLA-1 S70G con TRIS y sulbactam y TLA-1 (naranja) con ácido clavulánico (rojo) superpuestos.

Se analizaron ambas estructuras con sus respectivos ligantes con el programa LigPlot+ que nos permite visualizar en dos dimensiones las interacciones del ligando con la proteína (Wallace *et al.*, 1995). En la estructura con una molécula de TRIS como ligando solo se encontraron tres interacciones hidrofóbicas entre los residuos Thr216, Arg 220 y Gly 217 y la molécula TRIS. En la estructura con el intermediario trans-enamina del sulbactam se encontró que este intermediario está estabilizado por puentes de hidrógeno con los residuos Thr 235 de 3.1 Å y Gly 217 de 3 Å, y muestra interacciones hidrofóbicas con los residuos Arg 220, Pro 218, Arg 129, Trp 105, Ser 130, y Thr 216 como se puede ver en la figura 24. La Thr 235 ya había sido reportada anteriormente como uno de los residuos que estabilizan el

**complejo  $\beta$ -lactamasa e inhibidor** (Ruggiero, 2017) (Jin, 2017). En cambio, la Gly 217 no ha sido reportada con anterioridad; sin embargo, cabe destacar que la única estructura que se tiene como referencia para el acomodo del inhibidor, en esta parte del sitio activo, es la estructura silvestre de TLA-1. En el resto de las estructuras reportadas el inhibidor se encuentra en unión covalente con la Ser 70 y la Gly 217 queda muy lejos como para formar puentes de hidrógeno con el inhibidor. Entonces, el hecho de que este residuo no se haya reportado con anterioridad refuerza la idea de que la forma en la que TLA-1 interactúa con el inhibidor es diferente que en otras  $\beta$ -lactamasas, y la existencia de un posible mecanismo de inhibición diferente que explique la resistencia tanto a antibióticos como a inhibidores es una posibilidad real.



residuos con la estructura de TLA-1 silvestre y en complejo con ácido clavulánico todos se encuentran en la misma orientación, confirmando que el cambio de Ser 70 a Gly y de ácido clavulánico a sulbactam no afecta en la estructura general de ningún aminoácido de la proteína, menos aún de los que conforman al sitio activo.

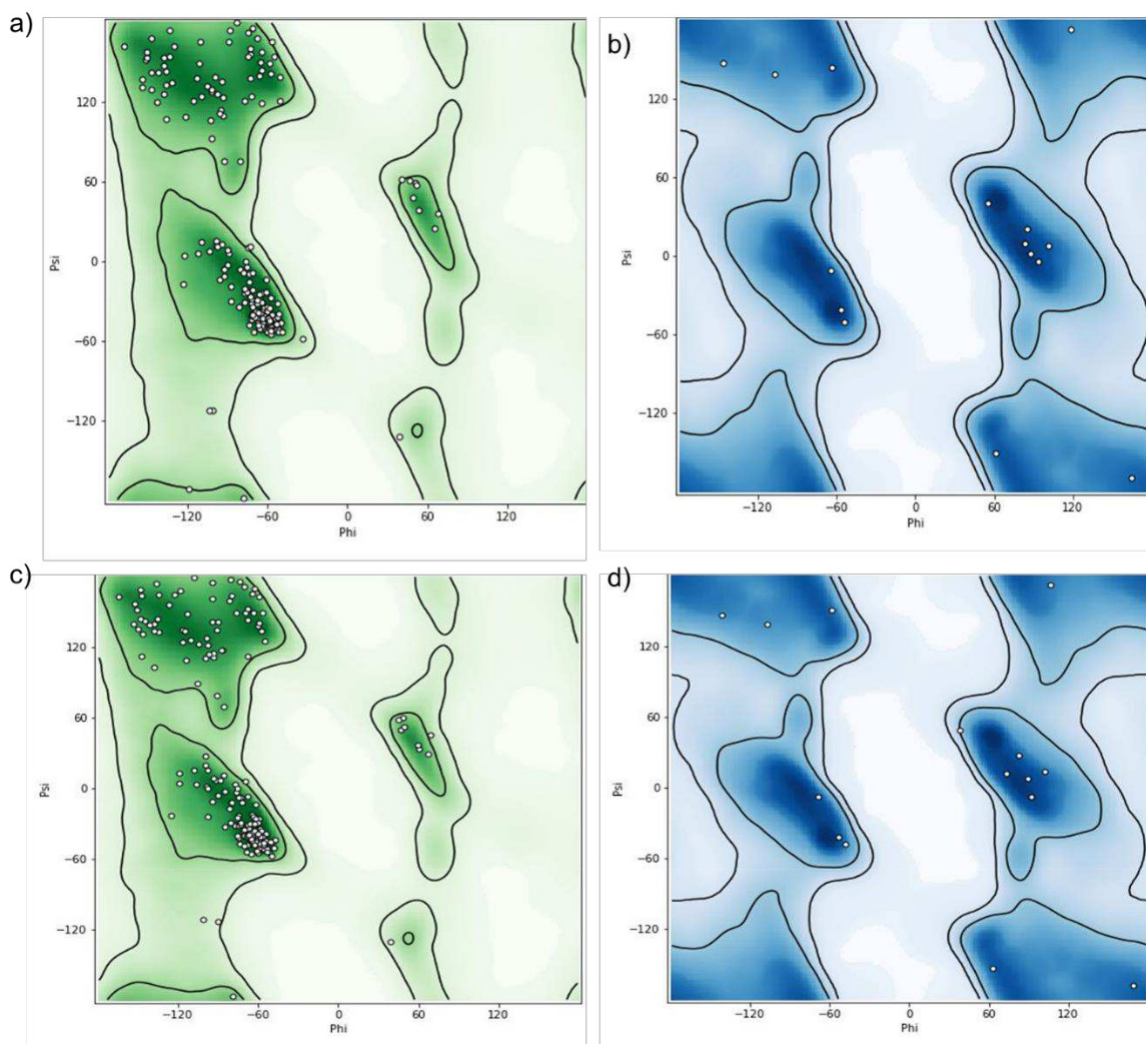


Figura 25. Gráficos de Ramachandran. a) General; verde oscuro zonas favorecidas, verde claro zonas permitidas para TLA-1 S70G con TRIS b) Glicinas; azul oscuro zonas favorecidas, azul celeste zonas permitidas para TLA-1 S70G con TRIS. C) General para TLA-1 S70G con sulbactam d) Glicinas TLA-1 S70G

Para determinar que molécula se encontraba en el sitio activo, primeramente, se afinaron las estructuras sin ningún ligante en el sitio activo (Figs. 25 y 26 a). Posteriormente, al aparecer un pico de densidad electrónica positivo (verde), que indica la falta de átomos, en dicha cavidad catalítica, se agregaron uno a uno, los modelos de las moléculas que interaccionaron en algún momento con la proteína

(desde su expresión hasta su purificación y cristalización) y cuyo tamaño fuera similar al pico de densidad electrónica del sitio activo. Se inicio con TRIS, presente en el amortiguador con el que se concentró la proteína y en el cristal de menor tiempo de remojado esta molécula explicó el mapa de densidad (Fig. 26). Partiendo de lo anterior para el cristal con más tiempo de remojado se intentó modelar TRIS en el pico de densidad electrónica vecino a la Ser 237. Dado que esta molécula no explicó la densidad electrónica, se intentó modelar tanto una molécula de sulbactam intacta, como el intermediario trans-enamina de la misma, por ser el intermediario más estable y el mayormente reportado **en complejos cristalográficos de  $\beta$ -lactamasas con inhibidores** (Fig. 27) (Rodkey *et al.*, 2012; Padayatti *et al.*, 2005).

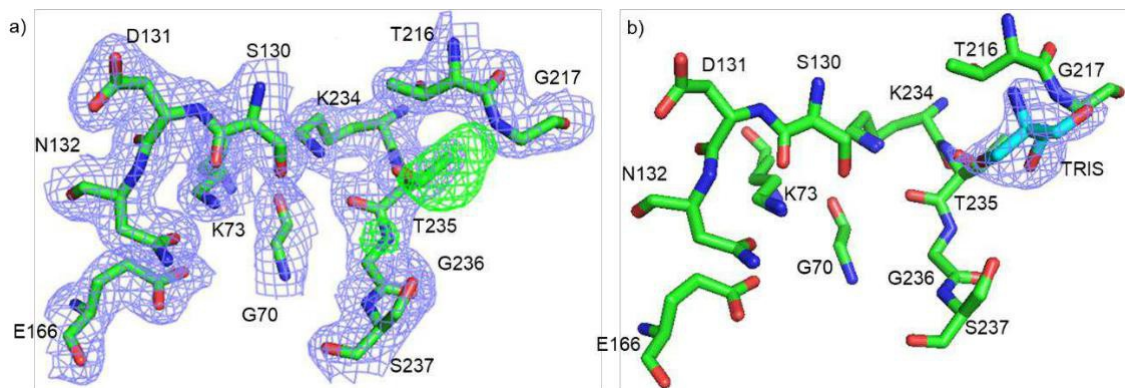


Figura 26. Sitio activo de TLA-1 S70G cristal 1 con menor tiempo de remojo, mapa de densidad electrónica  $2F_o-F_o$  en azul a  $1 \sigma$  y el  $F_o-F_c$  a  $\pm 3.5 \sigma$  en verde y rojo. a) sitio activo vacío. b) sitio activo con TRIS

En el análisis de la estructura. con mayor tiempo de remojado, con las diferentes moléculas ocupando el sitio activo, se puede observar como el mapa de diferencias,  $F_o-F_c$ , muestra ciertas inconsistencias con el modelo calculado tanto en picos positivos como negativos en rojo, (que indican el exceso de átomos en una posición específica). El mapa de densidad,  $F_o-F_c$  se explica mejor utilizando las coordenadas del intermediario trans-enamina del sulbactam. A pesar de lo anterior, existe un pequeño pico negativo que puede ser explicado por un problema en el cálculo de ocupación, es decir, que el intermediario no se encuentra presente en todas las copias de la proteína dentro del cristal. Una vez que se consideró que la ocupación del intermediario trans-enamina, no es 100%, se decidió recalcular las fases con

ocupaciones de 90%, 80% y 70%; la de 90% no mostró diferencias con la de 100%, por lo que se descartó. Después de un análisis detallado, se concluyó que el valor de ocupación que explica mejor a los mapas experimentales del sitio activo de TLA-1 S70G, implica un intermediario trans-enamina con una ocupación del 80%.

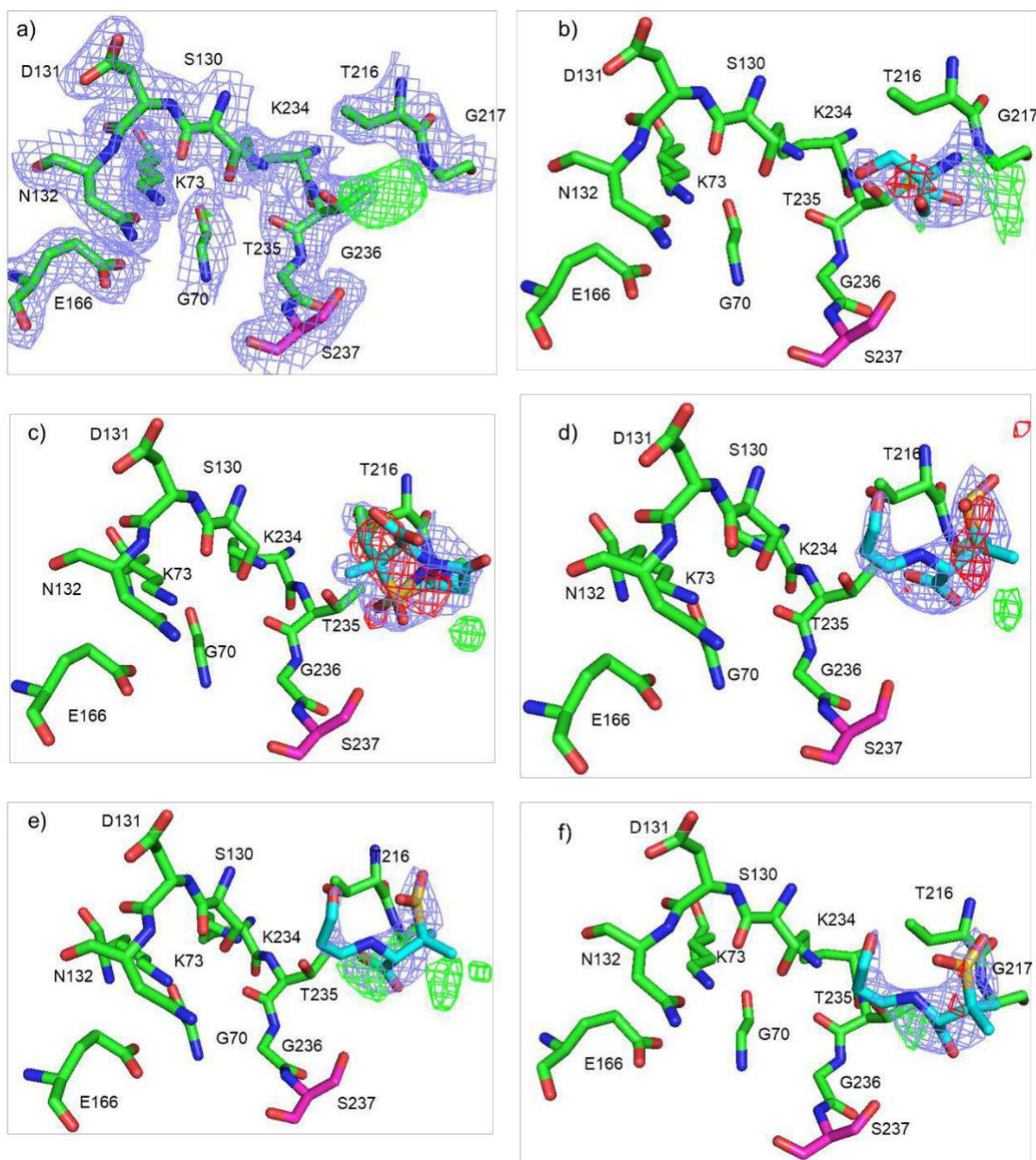


Figura 27. Diferentes moléculas en el sitio activo de TLA-1 S70G cristal con mayor tiempo de remojo, mapa de densidad electrónica 2Fc-Fo en azul a 1  $\sigma$  y el F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub> a  $\pm 3.5 \sigma$ . a) sitio activo vacío. b) sitio activo con TRIS c) sitio activo con una molécula de sulbactam intacta. d) sitio activo con intermediario trans-enamina de sulbactam ocupación 100% e) sitio activo con intermediario trans-enamina de sulbactam ocupación 70% f) sitio activo con intermediario trans-enamina de sulbactam ocupación 80%.

El mapa de densidad electrónica,  $2F_o-F_c$ , se explica bien con una molécula del intermediario trans-enamina del sulbactam, con una ocupación del 80%; sin embargo, la existencia de pequeñas señales positivas y negativas del mapa de diferencias,  $F_o-F_c$ , indican que el modelo no explica completamente a la densidad electrónica, una razón para explicar este comportamiento podría ser la elevada cantidad de solvente, 78%, en TLA-1 S70G (calculado con la herramienta MATTPROB; Matthews, 1968). Se realizó un *Polder map* tanto de las estructuras las diferentes moléculas ocupando el sitio activo. Un *Polder map* es una herramienta del programa *Phenix* que permite remover el ruido del solvente, el cual podría estar cubriendo densidades débiles. Algunas de las situaciones en las que se aplica esta herramienta son en las regiones con ligandos, con los residuos con una orientación variable como la lisina y en los extremos N o C terminales (Liebschner *et al*, 2019). Si bien, todos los mapas resultaron ser muy similares entre sí, en el *Polder map* realizado a la estructura con el intermediario, se puede observar como el mapa de densidad generado coincide con la silueta del intermediario trans-enamina, lo que nos permite confirmar que la molécula se encuentra en el sitio, aunque no con una ocupación del 100%, es decir no en todas

las copias del cristal (Fig. 28).

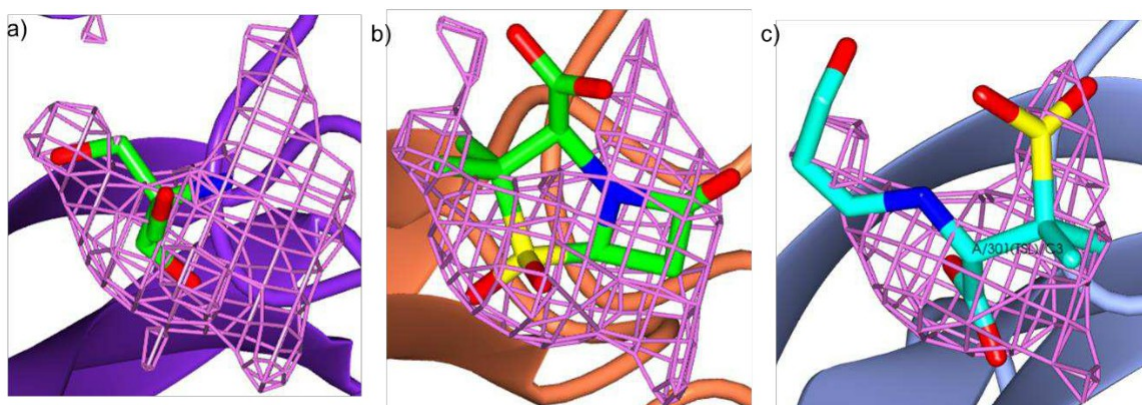


Figura 28. Polder maps a  $\pm 3.5 \sigma$  en color rosa de a) sitio activo con TRIS, b) sitio activo con una molécula de sulbactam intacto, c) sitio activo con intermediario trans-enamina.

Otra razón por la que el mapa de densidad electrónica,  $2F_o-F_c$ , que envuelve al intermediario trans-enamina se muestre discontinuo es por su alta movilidad, característica encontrada en el 2005 por Padayatti y colaboradores, siendo este



intermediario **el más móvil en los tres inhibidores  $\beta$ -lactámicos** (Padayatti *et al.*, 2005). Debido a lo anterior se buscó en el PDB (*Protein Data Bank*) estructuras de  $\beta$ -lactamasas en complejo con sulbactam. Se encontraron seis estructuras, todas de la subclase A1 con los códigos de PDB 4FH2, 2A3U, 2H0Y, 6H2K, 6ITY y 6J2B y en todas se puede observar el mapa de densidad electrónica,  $2F_o-F_c$ , incompleto, debido a la flexibilidad de esta molécula (Fig. 29) (Padayatti *et al.*, 2005; Qipeng *et al.*, por publicar; Rodkey, 2012; Tassoni *et al.*, 2019; Totir *et al.*, 2006). Llama la atención que todas estas estructuras tienen menor porcentaje de solvente las reportadas en esta tesis, por lo que estos intermediarios podrían tener menos movilidad que el encontrado en el cristal de TLA-1 S70G.

Tabla 3. **Lista de las estructuras de  $\beta$ -lactamasas en complejo con sulbactam** depositadas en el PDB.

Código de PDB	$\beta$ -lactamasa	Resolución (Å)	$R_{work}/R_{free}$	Solvente (%)
4FH2	SHV-1 S70C	1.44	0.20/0.22	38.3
2A3U	SHV-1 E166A	1.34	0.17/0.19	36.8
2H0Y	SHV-1 M69V E166A	1.70	0.17/0.21	47.9
6H2K	BlaC	1.90	0.18/0.22	41.3
6ITY	CTX-M-64	2.14	0.16/0.22	32.9
6J2B	CTX-N-64 S130T	1.44	0.15/0.18	31.6

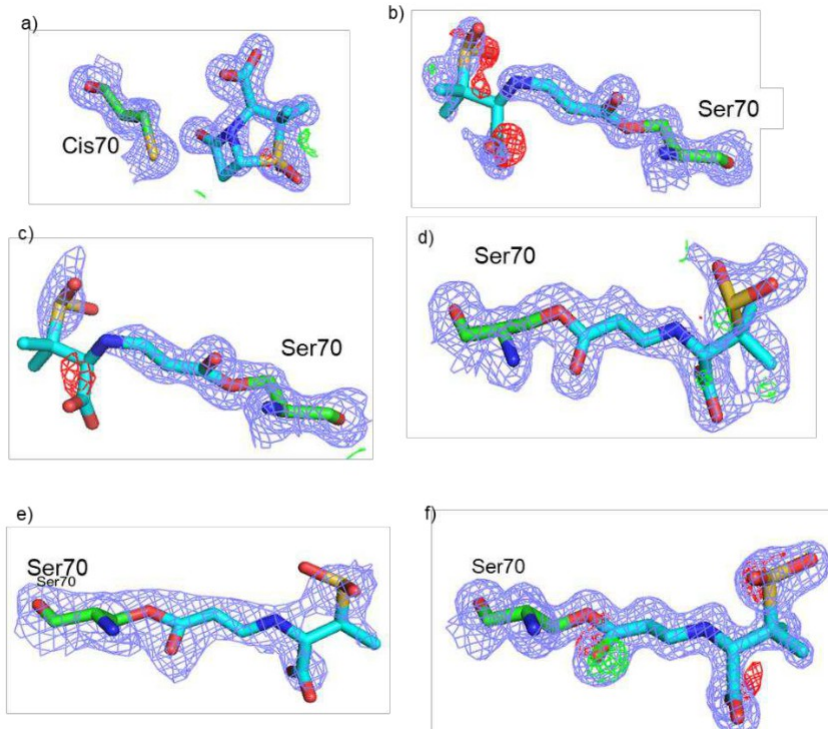


Figura 29. a) Estructuras de  $\beta$ -lactamasas de la subclase A1 en complejo con sulbactam. Mapa de densidad  $2F_o-F_o$  a  $1 \sigma$  (azul) y  $F_o-F_o$  a  $\pm 3.5 \sigma$  (verde y rojo) a) 4FH2, b) 2A3U, c) 2H0Y, d) 6H2K, e) 6ITY y f) 6J2B

También se analizó el parámetro de desplazamiento atómico (PDA), como indicativo de la amplitud de las oscilaciones atómicas, causadas en parte por la fluctuación térmica, normalmente presenta valores de  $2-100 \text{ \AA}^2$  en ajustes isotrópicos (Carugo, 2018). El intermediario trans-enamina del sulbactam tiene un valor de PDA de  $63 \text{ \AA}^2$  y se comparó este valor, con los valores de los residuos cercanos a este ligando, siendo la Ser 237 con un valor de  $39 \text{ \AA}^2$ , Thr 235 con  $34.5 \text{ \AA}^2$ , Gly 217 con  $42 \text{ \AA}^2$  y la Arg 220 con  $38 \text{ \AA}^2$ . El valor del intermediario trans-enamina del sulbactam indica una mayor movilidad del ligando en comparación con el resto de los residuos, cabe resaltar que este ligando solo está unido por dos puentes de hidrogeno con la Thr 235 y Gly 217, y que se encuentra expuesto al solvente, por lo que un valor más alto era esperado. También se analizaron los **valores de PDA para las estructuras de  $\beta$ -lactamasas A1 en complejo con sulbactam** que están en el PDB, y en todas se encontró esta misma peculiaridad. (Tabla 3). El PDA de la Ser 70 se encuentra muy por debajo que el del sulbactam,

indicando la mayor movilidad de estos ligandos, aun cuando estén formando un enlace covalente con la Ser70.

Tabla 4. **Tabla de valores de PDA de  $\beta$ -lactamasas en complejo con sulbactam.**

PDB ID	PDA Residuos	PDA Sulbactam
4FH2	Ser 70 11.42 Ser 130 15.58 Thr 235 13.91 Ala 237 12.35 Arg 244 14.54	21.67
2A3U	Ser 70 9.25 Asn 132 10.34 Asn 170 30.2 Ala 237 42.6	35.71
2HOY	Ser70 14.3666667	51.50
6H2K	Ser70 6.45166667	21.71
6ITY	Ser70 11.725 Asn 104 28.43 Asn 132 18.76 Asn 170 16.41 Ser 237 17.31	47.02
6J2B	Ser70 11.5883333	21.02
TLA-1 S70G	Ser 237 39 Thr 235 34.5 Gly 217 42	63.00

Si bien, no se observa directamente el enlace covalente con el C7 del grupo carboxilo del intermediario trans-enamina del sulbactam, la presencia del mismo intermediario, por sí mismo, significa que la hidrólisis se llevó a cabo, pero esto no indica necesariamente cual residuo sustituyó a la Ser70 en la reacción, siendo la opción más factible la Ser 237, debido a que el complejo de TLA-1 con ácido clavulánico, mostro el complejo acil-enzima mediado por la Ser 237 (Cifuentes *et al.*, 2019). Retomando esos resultados de la prueba de actividad especifica donde la mutante TLA-1 S70G tiene una actividad de  $0.235 \pm 0.007 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , mucho menor a la actividad de la enzima silvestre de  $1082.872 \pm 0.007 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  indicando que la mutante sí presenta actividad, una posible explicación para la elevada diferencia de actividad entre ambas enzimas podría ser la ausencia de un receptor de protones. En el caso de la Ser 70, el Glu 166 y en su ausencia la Lys 73, son los responsables de sustraer el protón de la Ser 70, aunque la reacción en ausencia del Glu 166 es menos eficaz. Aparte de estos dos residuos, no hay

evidencia de ninguno otro residuo que sea capaz de activar a la Ser 70. Tomando esto en cuenta, se buscaron los Glu y Lys que estuvieran a menos de 3.6 Å del O de la Ser 237 (Fig. 32), pero no se encontró ningún posible activador de la Ser 237. La ausencia de un activador podría ser la causa de la menor eficacia catalítica de la mutante TLA-1 S70G medida por Cifuentes en el 2019. También se buscaron asparaginas e histidinas, ya que en las proteasas de serina reactiva la triada catalítica incluye Asp e His. Únicamente se encontró un Asp cerca (Fig. 32d), el 239; sin embargo, este residuo está a casi 10 Å de la Ser 237, lo que haría muy difícil que funcionara como activador de esta.

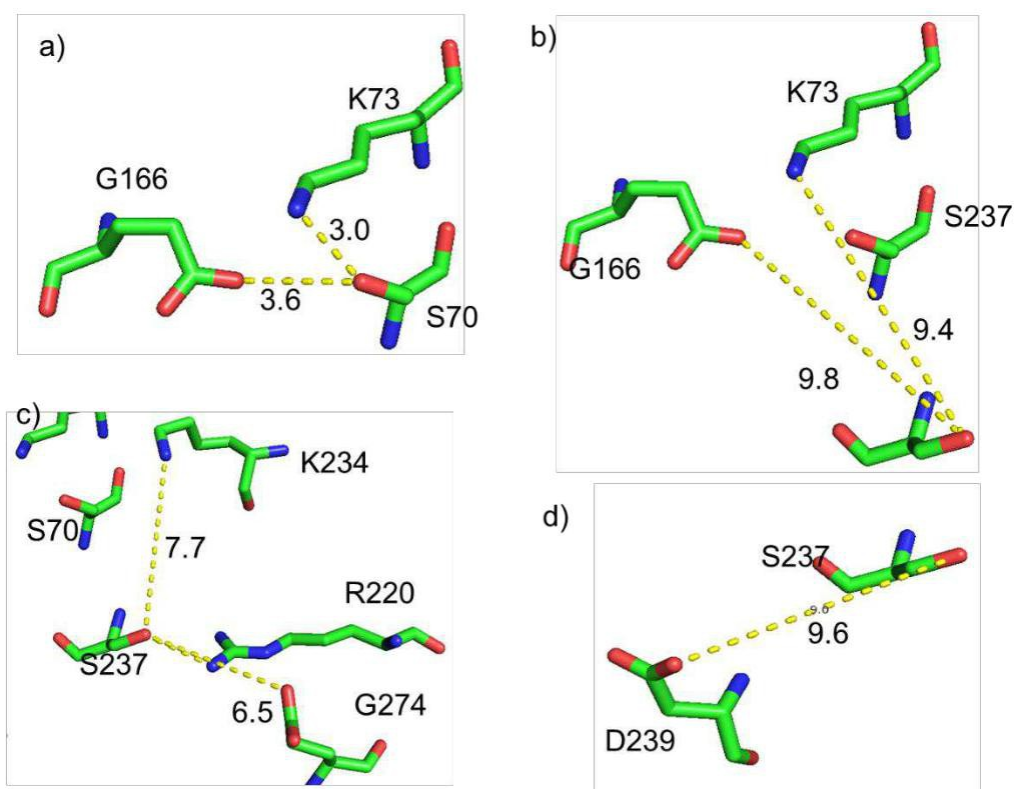


Figura 30. a) Distancias entre Glu 166 (3.6 Å) y Lys 73 (3 Å) con Ser 70 b) Distancias entre Glu 166 (6.8 Å) y Lys 73 (7.9Å) con Ser 237 c) Distancia entre Ser 237 y Lys 234 (8.8 Å) y Ser 237 y Glu 274 (6.6 Å) d) Distancia entre Asp 239 y Ser 237 (8.9Å).

**Otra determinante en la actividad catalítica de las  $\beta$ -lactamasas** es la estabilización del intermediario tetraédrico mediante un agujero de oxianión que normalmente está conformado por los grupos amino de los residuos 69, 70, 236 y 237. Por lo tanto, la falta de un agujero de oxianión que estabilice el complejo formado con la

Ser 237 puede ser responsable de la baja actividad catalítica. En la estructura de TLA-1 en complejo con ácido clavulánico obtenida por Cifuentes en el 2019, se muestra como el único grupo amino que podría estabilizar este complejo es el de la Arg 220, sugiriendo que esta falta de cargas positivas cerca del oxígeno cargado negativamente del intermediario tetraédrico, son otro factor limitante en la actividad de la enzima.

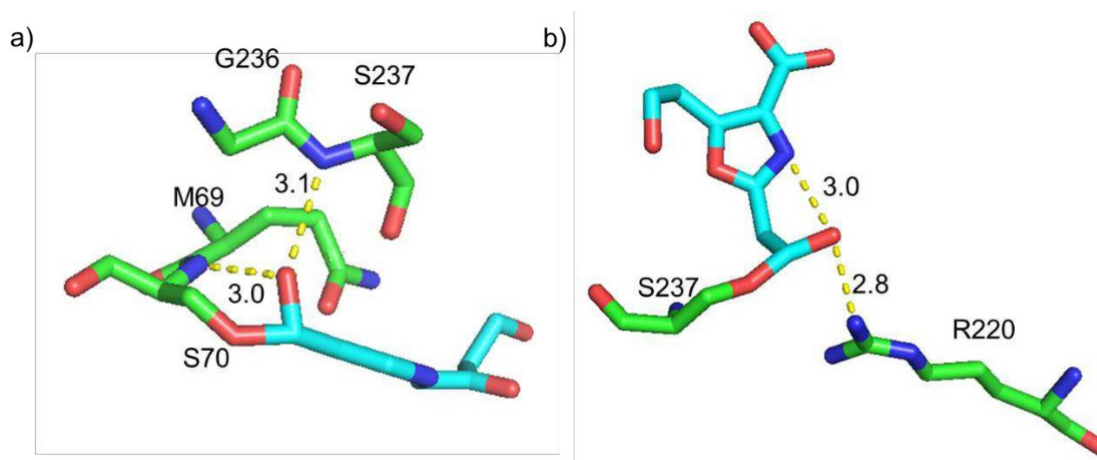


Figura 31. Agujero de oxianión en TLA-1 a) Distancias entre los residuos que conforman el agujero de oxianión y el intermediario trans-enamina unido a la Ser70. b) Distancias entre el oxígeno del C7 con el grupo amino del R220 y el grupo amino del anillo de tiazolidina del sulbactam. Modificado de Cifuentes *et al.*, 2019

Con el fin de entender porque TLA-1 presenta una segunda serina catalítica y pensando que ésta podría ser la causa de la resistencia a antibióticos e inhibidores, **se realizó un alineamiento de secuencias de diferentes  $\beta$ -lactamasas** de la subclase A2 (Fig. 33). La base de datos fue construida mediante el servidor *FASTA.ebi*, **depositando la secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ -lactamasa TLA-1 de *Escherichia coli*** como referencia y con un número de *hits* de 500 alineamientos (Madeira *et al.*, 2019). Se obtuvieron secuencias **homólogas de la  $\beta$ -lactamasa TLA-1** que posteriormente fueron curadas en el alineamiento. El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo con el programa *MEGAX* usando el algoritmo de *ClustalW* (Kumar *et al.*, 2018). Posterior al primer alineamiento se curaron las secuencias con el fin de reducir las penalizaciones del alineamiento, quedando una base que pasó de 500 secuencias a 49. De las 493 secuencias de proteínas se analizó el nivel de conservación de la Ser 237 de TLA-1 con respecto a las otras

BLEE del tipo A2 con el programa *Jalview* 2.10.5 (Waterhouse *et al.*, 2009) mostrando que esta serina tiene un nivel de conservación del 40.8%. En su lugar se encontraron los residuos: Thr, Ala, Ile, Trp, Asn, Arg, Tyr, His, Leu, Met, Phe y Val con un porcentaje de conservación de 17%, 15%, 14%, 4.7%, 1.6%, 1.6%, 1.6%, 1.2%, 1%, 0.8%, 0.4% y 0.2% respectivamente. Este resultado junto con los antecedentes sugiere que el cambio de la Ser 237 puede ser una innovación evolutiva con respecto a las otras  $\beta$ -lactamasas de tipo A2 de organismos patógenos.

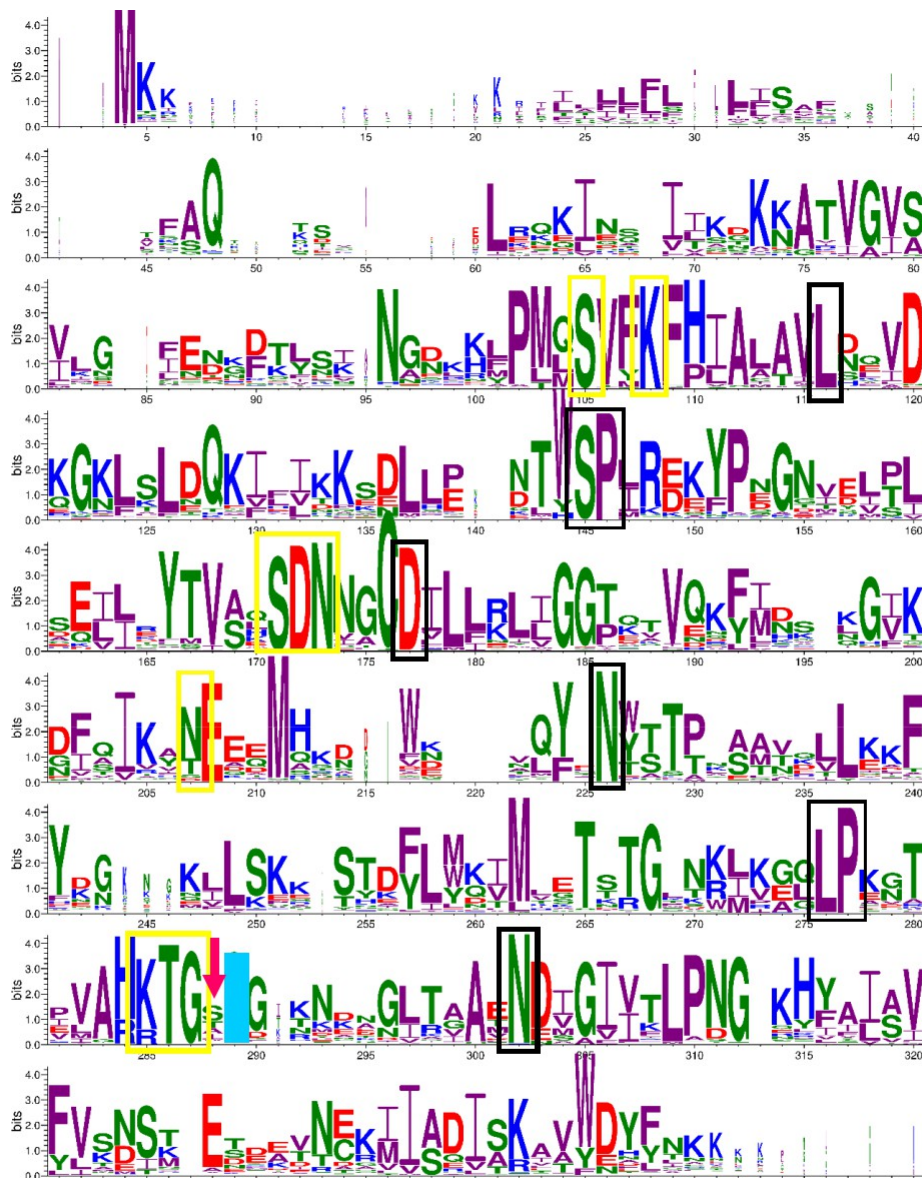


Figura 32. Alineamiento de 493  $\beta$ -lactamasas de clase A2 con residuos del sitio activo (cuadro amarillo), residuos conservados al 100% (cuadro negro), Ser 237 (flecha rosa) y Ser 238 (cian). Realizado con la herramienta WebLogo (Crooks *et al.*, 2004)

En el alineamiento llama la atención la conservación del 98.6% de la Ser 238 en la subclase A2, ya que esta serina se encuentra relativamente lejos del sitio activo (Fig. 34) **y no se ha reportado ninguna estructura de  $\beta$ -lactamasa de la clase A que interaccione mediante este aminoácido con algún antibiótico o inhibidor  $\beta$ -lactámico** incluso se puede observar cómo los grupos hidroxilo<sup>-</sup> de esta serina están apuntando hacia el lado opuesto del sitio activo, únicamente se ha visto que es capaz de formar puentes de hidrógeno con la Thr 239 en CTX-M-69 de *E. coli* en complejo con sulbactam (PDB 6ITY) y en la estructura de BlaC de *Mycobacterium tuberculosis*, tanto con sulbactam como con tazobactam, se forma este puente de hidrógeno (PDB 6H2K y 6H2I). Esta Ser 238 altamente conservada podría ayudar indirectamente a la estabilización del complejo, pero su conservación únicamente **en  $\beta$ -lactamasa de subclase A2 BLEE**, sugiere que esta modificación, podría estar involucrada con la resistencia a ser inactivada.

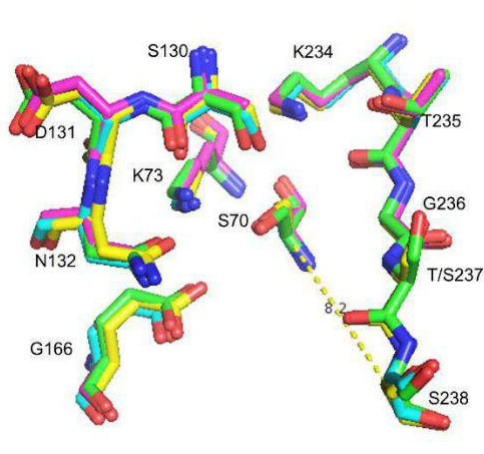


Figura 33. Distancia entre Ser238 y Ser70. PER-1 (cian) PER-2 (magenta), TLA-3 (amarillo), TLA-1 (verde)

En los primeros trabajos en los que se buscó entender el papel del residuo 238 Bouthors y colaboradores en 1998 trabajaron con la mutante de SHV-1 G238S y concluyeron que la Ser 238 alteraba el sitio activo haciéndolo menos hidrofóbico, favoreciendo un mejor acomodo de antibióticos del tipo de las cefalosporinas. Posteriormente se trabajó con la mutante TEM-19, resistente a inhibición, donde encontraron que la Ser 238 se encuentra orientada hacia el sitio activo, debido a la interacción con Asn 170, en una posición que le permite formar puentes de

hidrógeno con el oxígeno del grupo oxima (Dubus *et al.*, 1994). En mutantes de PER-1 S238G y S238A la actividad catalítica de la enzima no se vio afectada por lo que no hay resultados concluyentes de la importancia de este residuo **en esta  $\beta$ -lactamasa** (Bouthors *et al.*, 1998).

En BLEE A1 es más común encontrar una glicina en la posición 238, lo cual incrementa la flexibilidad de la lamina  $\beta$ 3, haciendo posible la unión a sustratos más voluminosos. La mutante G238S de TEM-1, **una  $\beta$ -lactamasa A1** que no presenta el fenotipo de espectro extendido, mostró un incremento del 150% en su actividad catalítica con el antibiótico cefotaxima (Ibuka *et al.*, 2003; Shimizu-Ibuka *et al.*, 2011).

El análisis **del alineamiento de las secuencias  $\beta$ -lactamasas** de la subclase A2 nos permitió visualizar enzimas que no tienen conservados los residuos propuestos por Ambler para su clasificación. Únicamente la Ser 70, Lys 73, P 107, Asp 131 y la Lys/Arg 234 se encuentran conservados en el 100% de las secuencias. Las secuencias que mostraron residuos no conservados no tienen más información estructural, no son mutantes, y todas fueron subidas al NCBI en el 2019, en contraste con la clasificación propuesta en 1980, por lo que se debería de tomar en cuenta para una nueva propuesta de clasificación. También se encontraron residuos conservados al 100% en el alineamiento, dos de estos residuos, Asp 136 y Asn 179 fueron reportados por Phillipon en el 2016 y otros 3 no habían sido reportados con anterioridad Leu 81, Ser 106, Pro107, Asn 245, Leu 225 y Pro 226 (Fig. 35), los cuales al igual que los reportados, no estar cerca del sitio activo, por lo que probablemente tengan una función estructural.



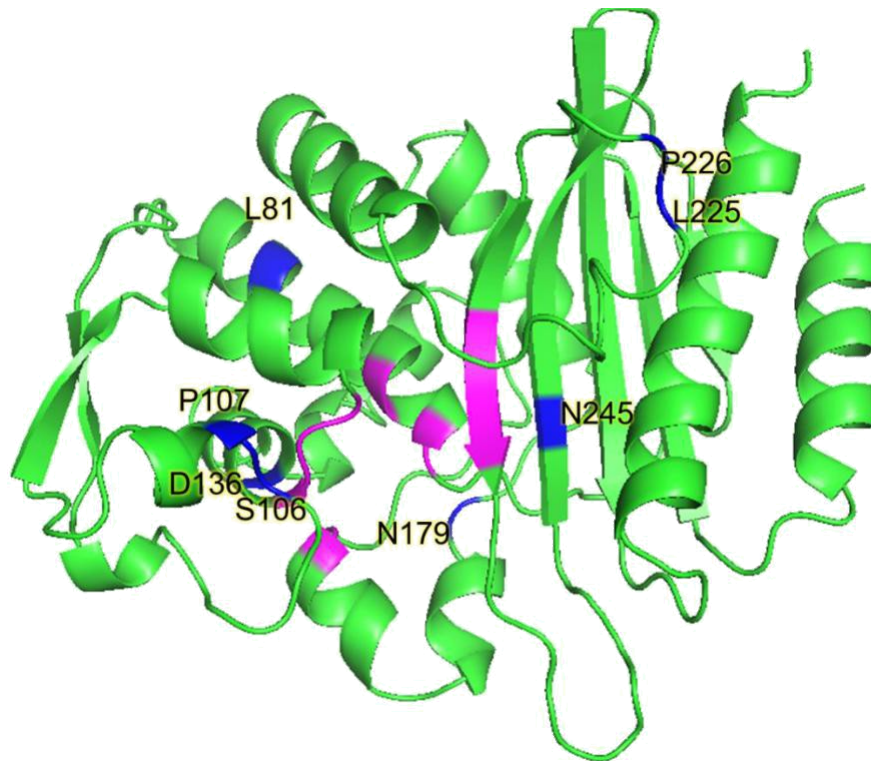
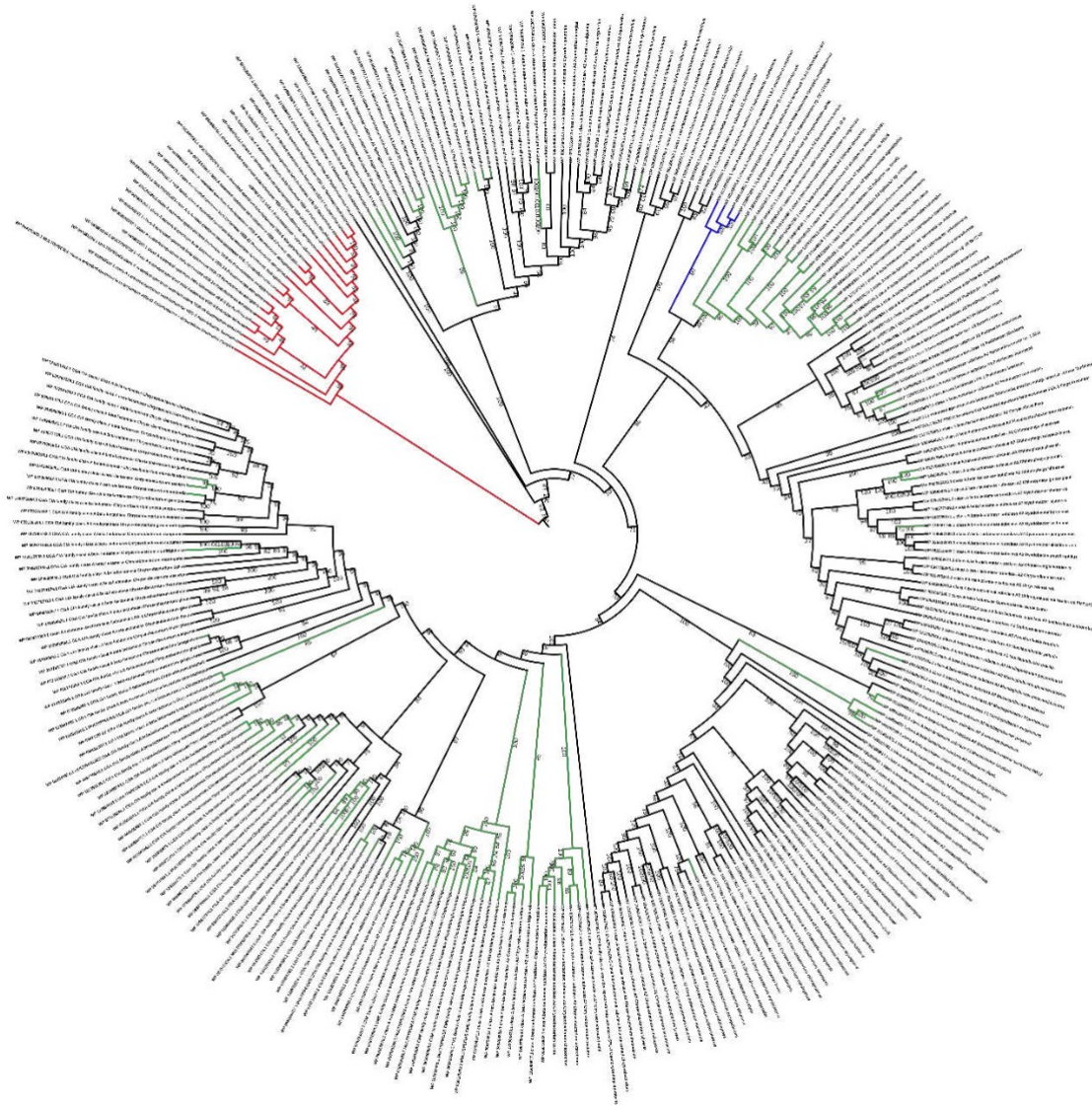


Figura 34. Estructura de TLA-1 con los residuos conservados en  $\beta$ -lactamasas A2 al 100% (azul) y el sitio activo (magenta).

Con el fin de evaluar el impacto de las modificaciones descritas en TLA-1, en un contexto más amplio, se realizó una filogenia a partir del alineamiento de las  $\beta$ -lactamasas A2, se tomó el alineamiento previamente descrito y se corrió un análisis filogenético en el programa IQ-TREE instalado en la computadora Miztli del Laboratorio Nacional de Computo de Alto Desempeño (LANCAD) de la UNAM. El análisis filogenético se realizó mediante el método de máxima verosimilitud con un modelo de sustitución de aminoácidos *LG* y un análisis de soporte de grupo de 1000 *bootstraps* (Morrone, 2013). **Los resultados de este análisis arrojaron que la  $\beta$ -lactamasa TLA-1 de *E. coli* se encuentra en un grupo monofilético independiente de las otras  $\beta$ -lactamasas tipo A2, junto con otras tres  $\beta$ -lactamasas de la familia TLA.** Este resultado indica que TLA-1 tiene una historia evolutiva diferente a la de otras BLEE y que a pesar de ser homóloga a **otras  $\beta$ -lactamasas** provenientes de *E. coli* la distancia evolutiva que hay entre TLA-1 con respecto a otras beta-lactamasas del mismo organismo es muy grande. El cladograma, producto del análisis anterior, fue editado en el servidor *ITOL* (Letunic *et al.*, 2007).



**Figura 35. Cladograma de  $\beta$ -lactamasas de la subclase A2. Familia TLA en azul. Familia VEB (grupo externo) en rojo.  $\beta$ -lactamasas con equivalente a Ser 237 en verde.**

Llama la atención la presencia de la Ser 237 o equivalente en diferentes taxas, y que las BLEE de la familia TLA se encuentran formando un clado discreto con respecto **al resto de las  $\beta$ -lactamasas**, y en el mismo clado donde se encuentra la familia TLA, se comprende un clado más basal o emparentado que tiene a la Ser 237 conservada, que comprende a organismos de diferentes géneros como *de*

*Flavobacterium*, *Dysgonomonas*, *Alistipes*, *Apibacter*, *Bacteroides*, entre otras. Otro clado donde se encuentra la Ser 237 ampliamente conservada, está compuesto por especies de los géneros *Chryseobacterium* y *Elizabethkingia* mayoritariamente. De los géneros mencionados anteriormente hay muchas especies que no cuentan con la Ser 237. Llama la atención de las bacterias donde la Ser 237 se encuentra presente, la mayoría son bacterias no patógenas para el ser humano, encontradas generalmente en muestras de tierra y agua, algunas de estas incluso de la Antártida. Los géneros *Chryseobacterium* y *Elizabethkingia* solían ser parte del género *Flavobacterium*, pero estudios más filogenéticos detallados separaron al género *Chryseobacterium* primero y de este separaron al género *Elizabethkingia* ya que algunas especies de *Chryseobacterium* eran lo suficientemente diferentes como para representar un linaje diferente dentro de la familia *Flavobacteriaceae* (Kim *et al.*, 2005). Estos 3 géneros no solo son muy cercanos, también comparten hábitats, y son altamente resistentes a antibióticos, característica atribuible a la presencia de hongos y plantas productoras de compuestos antimicrobianos y también a la enorme dispersión de antibióticos usados por el humano. Aunado a esto en ambos géneros se ha visto un reciente incremento de presencia en casos clínicos especialmente en pacientes inmunocomprometidos, pediátricos, con lesiones severas o que utilizan dispositivos como respiradores catéteres entre otros, al ser relativamente nuevo su presencia en asilados clínicos, no se tiene una terapia efectiva para tratar a los pacientes (Mukerji, 2016). En el caso de *Chryseobacterium* únicamente las especies *C.indologenes*, *C.gleum*, *C. timonianum*, *C. mucoviscidosis* y *C.hominis* han sido aisladas de pacientes hospitalizados (*C. hominis* es **la única que no presenta una  $\beta$ -lactamasas** con la Ser 237) (Abdallah, 2017; Tetz, 2018, Guiu, 2013). En el género *Elizabethkingia* hay dos especies conocidas como patogénicas *E. anophelis* y *E. meningoseptica*, la primera es transmitida por un mosquito causando un brote en el 2016 en Wisconsin donde murieron 18 personas a causa de esta bacteria y la segunda es conocida desde los 80's como el agente causante de la meningitis neonatal (Dziuban 2018; Perrin 2016). Al estar estos géneros tan emparentados filogenéticamente hablando y el aumento de casos clínicos con bacterias de estos géneros podría significar que la

Ser 237 sea una innovación evolutiva que está teniendo una presión selectiva no solo en TLA-1 si no en todas esas especies, donde la Ser 237 está presente, y que parecieran estar emergiendo en nuevas infecciones. Por otro lado, la presencia de bacterias de diferentes géneros, no tan emparentados, **que produzcan  $\beta$ -lactamasas** son la Ser 237, y que comparten hábitat podría generar también la dispersión por transferencia horizontal, ya que muchas se encuentran en cuerpos de agua donde fácilmente podrían compartirse material genético tanto de otras bacterias como de los desechos producidos por las diferentes actividades humanas.

El segundo residuo más conservado en la posición 237 es la treonina, conservada **en todas las secuencias de las  $\beta$ -lactamasas** de la familia VEB, y de todas las  $\beta$ -lactamasas con la Thr 237 conservada, únicamente en la familia VEB se encuentran en bacterias patógenas. Esta distribución de Thr 237 nos sugiere que la conservación de este residuo fue por transferencia horizontal.

Otra alternativa a la Ser 70 podría ser la Ser 130 que en la estructura se encuentra a 5.3 Å de distancia, más cerca incluso que la Ser 237. En el 2004 Sun y colaboradores reportaron que una vez que la Ser 70 hidroliza al inhibidor, la Ser 130 es capaz de realizar un ataque nucleofílico en el C5 del inhibidor hidrolizado y unirse covalentemente a un fragmento del producto de la reacción catalizada por la Ser 70. La Ser 130 tiene a la Lys 234 a 3.3 Å de distancia, lo suficientemente cerca como para funcionar como activador, y un análisis con la herramienta PROPKA (Dolinsky, *et al.*, 2004) nos mostró que la Lys 234 tiene un pka atenuado a 6.0, al igual que la Lys 73 en ausencia de Glu 166 (Meroueh *et al.*, 2005), haciendo posible que la Lys 234 este desprotonada y pueda funcionar como un activador para la Ser 130. Se realizó el mismo análisis con algunas estructuras que tienen la mutación E166A y en todas se encontró el pka de la Ser70 atenuado a 5 y el de la Lys 234 en 8 siendo contundente con lo reportado por Meroueh y colaboradores en el 2005. También se calculó el pka de la Lys 234 en las  $\beta$ -lactamasas PER-1, PER-2, TLA-3 y las obtenidas por Cifuentes en el 2019 y en todas el pka esta atenuado alrededor de un valor de 6.5, excepto en la estructura de TLA-1 en complejo con ácido

clavulánico. En esta estructura el pka de la Lys 234 es de 3.79, afectado por la unión con el ligando. La presencia del receptor de protones no explica la baja actividad específica, a menos que también sea por la ausencia de un agujero de oxianión que estabilice el complejo tetraédrico. Esta serina está altamente **conservada en  $\beta$ -lactamasas de la clase A**, y esta conservación no concuerda con **la falta de reportes de  $\beta$ -lactamasas con ligandos unidos covalentemente a la Ser 130 en presencia o ausencia de la Ser 70**.

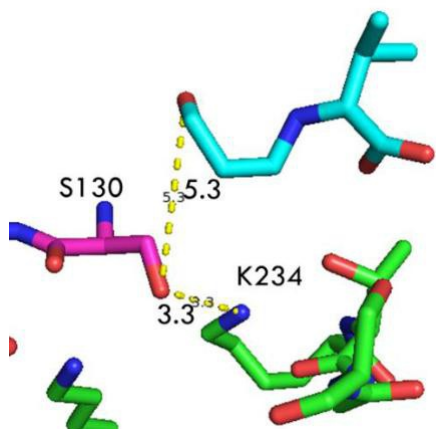


Figura 36. Distancias entre Ser 130 (magenta) con Lys 237 (verde) y el intermediario trans-enamina del sulbactam (cian).

## CONCLUSIONES

La obtención de una estructura con el intermediario trans-enamina del sulbactam hidrolizado en el sitio activo, nos comprobar la presencia de una serina catalítica en la mutante S70G de TLA-1. Este intermediario al estar interactuando con otra serina catalítica, diferente a la Ser 70, el acomodo del inhibidor es distinto, formando un puente de hidrógeno con la cadena principal de la Gly 217, interacción no reportada previamente.

**El alineamiento de secuencias de  $\beta$ -lactamasas A2** muestra la conservación (40%) que tiene la Ser 237, sugiriendo que su selección sea una innovación evolutiva. Adicionalmente, llama la atención que la Ser 237 sea catalítica, ya que no tiene estructuralmente ningún activador que la desprotone para iniciar el proceso catalítico de las  $\beta$ -lactamasas. Este hecho podría explicar la baja eficiencia catalítica de la mutante, pero abre la posibilidad, de que por presión evolutiva en el futuro existan variantes de  $\beta$ -lactamasas con más de una serina catalítica debido a la adquisición de un donador de protones.

El pka de la Lys 234 esta atenuado, haciendo posible que funcione como activador de la Ser 130, pero esto no explicaría la baja actividad de la enzima y la falta de reportes de otros complejos similares al descrito en esta tesis.

## **PERSPECTIVAS**

Obtener estructuras de TLA-1 silvestre en complejo con sulbactam para poder observar la unión covalente con la Ser 70 y/o Ser 237. También la obtención del complejo de TLA-1 silvestre y TLA-1 S70G con un inhibidor más voluminoso como el tazobactam para comparar en las estructuras el acomodo y las interacciones que establecen al inhibidor y comprobar si un ligando más grande como el tazobactam al igual que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos podrían dificultar la entrada de otro ligando que interactúe con la Ser 237. También sería interesante construir una mutante doble S70G S237G esperando una nula actividad específica, así como, una mutante doble S70G R220K o R220E esperando un incremento en la actividad de la enzima.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, R., Cimmino, T., Baron, S., Cadoret, F., Michelle, C., Raoult, D., Fournier P., Bittar, F. (2017). Description of *Chryseobacterium timonianum* sp. nov., isolated from a patient with pneumonia. *Antonie van Leeuwenhoek* 110, 1121– 1132. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0885-8>
- Adamski, C. J., Cardenas, A. M., Brown, N. G., Horton, L. B., Sankaran, B., Prasad, B. V. V., Gilbert, H. F., & Palzkill, T. (2015). Molecular basis for the catalytic specificity of the CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Biochemistry*, 54(2), 447–457. <https://doi.org/10.1021/bi501195g>
- Agga G.E., Arthur T.M., Durso L.M., Harhay D.M., Schmidt J.W. (2015) Antimicrobial-Resistant Bacterial Populations and Antimicrobial Resistance Genes Obtained from Environments Impacted by Livestock and Municipal Waste. *PLoS ONE* 10(7):e0132586. doi:10.1371/journal.pone.0132586
- Alcántar-Curiel, M.D., Alpuche-Aranda, C.M., Varona-Bobadilla, H.J., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M.D., Frías-Mendivil, M., Sanjuan-Padrón, L., Santos-Preciado, J.I. (2015). Risk factors for extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Escherichia coli* urinary tract infections in a tertiary hospital. *Salud Pública de México*, 57, 412–418
- Ambler. (1980). *The structure of Beta-lactamases*. 331, 153–178. <https://doi.org/10.1090/gsm/146/03>
- Aquino-Andrade, A., Merida-Vieyra, J., Arias De La Garza, E., Arzate-Barbosa, P., & De Colsa Ranero, A. (2018). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Mexico: Report of seven non-clonal cases in a pediatric hospital. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1166-z>
- Babic, M., Hujer, A. M., & Bonomo, R. A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*, 9(3), 142– 156. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2006.05.005>**
- Baig, M. H., Sudhakar, D. R., Kalaiarasan, P., Subbarao, N., Wadhawa, G., Lohani, M., Khan, M. K. A., & Khan, A. U. (2014). Insight into the effect of inhibitor resistant S130G mutant on physico-chemical properties of SHV type beta-lactamase: A molecular dynamics study. *PLoS ONE*, 9(12), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112456>
- Barrios, H., Garza-Ramos, U., Ochoa-Sanchez, L. E., Reyna-Flores, F., Rojas-Moreno, T., Morfin-Otero, R., Rodriguez-Noriega, E., Garza-Gonzalez, E., Gonzalez, G., Volkow, P., Cornejo-Juarez, P., Silva-Sanchez, J., Velázquez, M. R., Rodríguez-Galicia, V., Navarro-Navarro, M., Ayala, J., Guajardo-Lara, C. E., Novoa-Farias, O., Sánchez-Castro, I., Amaya-Larios, I. Y. (2012). A plasmid-encoded class 1 integron contains GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 4032–4034. <https://doi.org/10.1128/AAC.05980-11>
- Battye, T. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R., & Leslie, A. G. (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 67(Pt 4), 271–281. <https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>



- Bouthors, A., Dagoneau-blanchard, N., Naas, T., Nordmann, P., Jarlier, V., & Sougakoff, W. (1998). Role of residues 104, 164, 166, 238 and 240 in the substrate profile of PER-1  $\beta$ -lactamase hydrolysing third-generation cephalosporins *Biochemical Journal*, 1449, 1443–1449.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01076-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>.
- Carugo O. (2018). How large B-factors can be in protein crystal structures. *BMC bioinformatics*, 19(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2083-8>
- Chen, C. C. H., & Herzberg, O. (2001). Structures of the acyl-enzyme complexes of the *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -lactamase mutant Glu 166Asp:Asn170Gln with benzylpenicillin and cephaloridine. *Biochemistry*, 40(8), 2351–2358. <https://doi.org/10.1021/bi002277h>
- Cifuentes-Castro, V., Rodríguez-Almazán, C., Silva-Sánchez, J., & Rudiño-Piñera, E. (2019). The crystal structure of ESBL TLA-1 in complex with clavulanic acid reveals a second acylation site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 522(2), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.138>
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research*, 14(6), 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- Dantas Palmeira, J., & Ferreira, H. M. N. (2020). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production – a threat around the world. *Heliyon*, 6(1), e03206. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03206>
- Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research* 32 W665-W667 (2004).
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09>
- Dubus, a, Wilkin, J. M., Raquet, X., Normark, S., & Frère, J. M. (1994). Catalytic mechanism of active-site serine beta-lactamases: role of the conserved hydroxy group of the Lys-Thr(Ser)-Gly triad. *The Biochemical Journal*, 301 ( Pt 2, 485–494.
- Dziuban, E. J., Franks, J. L., So, M., Peacock, G., & Blaney, D. D. (2018). Elizabethkingia in Children: A Comprehensive Review of Symptomatic Cases Reported From 1944 to 2017. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 67(1), 144–149. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1052>
- Eiamphungporn, W., Schaduangrat, N., Malik, A. A., & Nantasenamat, C. (2018). Tackling the antibiotic resistance caused by class a  $\beta$ -lactamases through the use of  $\beta$ -lactamase inhibitory protein. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082222>
- Elizabeth A. Rodkey, Sarah M. Drawz, Jared M. Sampson, Christopher R. Bethel,

- Robert A. Bonomo and Focco van den Akker, 2012. (2012). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 66(Pt 4), 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Falagas, M. E., Mavroudis, A. D., & Vardakas, K. Z. (2016). The antibiotic pipeline for multi-drug resistant gram negative bacteria: what can we expect? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 14(8), 747–763. <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1204911>
- Falcone, M., & Paterson, D. (2016). Spotlight on ceftazidime/avibactam: A new option for MDR Gram-negative infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(10), 2713–2722. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw239>
- Fernandes, R. (2013).  $\beta$ -Lactams: Chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), 7–17. <https://doi.org/10.1097/MRM.0b013e3283587727>
- Frase, H., Smith, C. A., Toth, M., Champion, M. M., Mobashery, S., & Vakulenko, S. B. (2011). Identification of products of inhibition of GES-2  $\beta$ -lactamase by tazobactam by X-ray crystallography and spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 286(16), 14396–14409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208744>
- Gniadkowski, M. (2008). Evolution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*, 11–32. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01854.x>
- Golemi-kotra, D., & Kim, C. (2004). *The Importance of a Critical Protonation State and the Fate of the Catalytic Steps in Class A  $\beta$ -Lactamases and Penicillin-binding Proteins.* 34665–34673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313143200>
- Guiu A., Buendía B., Llorca L., Gómez-Punter R. M., Girón R. (2013) *Chryseobacterium* spp., ¿nuevo patógeno oportunista asociado a fibrosis quística? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(8):497–501 <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.08.003>
- He, D., Chiou, J., Zeng, Z., Chan, E. W. C., Liu, J. H., & Chen, S. (2016). Comparative characterization of CTX-M-64 and CTX-M-14 provides insights into the structure and catalytic activity of the CTX-M class of enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 6084–6090. <https://doi.org/10.1128/AAC.00917-16>
- Heidari Torkabadi, H., Bethel, C. R., Papp-Wallace, K. M., De Boer, P. A. J., Bonomo, R. A., & Carey, P. R. (2014). Following drug uptake and reactions inside *Escherichia coli* cells by Raman microspectroscopy. *Biochemistry*, 53(25), 4113–4121. <https://doi.org/10.1021/bi500529c>
- Helfand, M. S., Totir, M. A., Carey, M. P., Hujer, A. M., Bonomo, R. A., & Carey, P. R. (2003). Following the Reactions of Mechanism-Based Inhibitors with  $\beta$ -Lactamase by Raman Crystallography. *Biochemistry*, 42(46), 13386–13392. <https://doi.org/10.1021/bi035716w>
- Hermann, J. C., Pradon, J., Harvey, J. N., & Mulholland, A. J. (2009). High level QM/MM modeling of the formation of the tetrahedral intermediate in the acylation of wild type and K73A mutant TEM-I class A  $\beta$ -lactamase. *Journal of*

- Physical Chemistry A*, 113(43), 11984–11994.  
<https://doi.org/10.1021/jp9037254>
- Hubschwerlen, C. (2007). 7.17  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 7, 479–518.
- Ibuka, A. S., Ishii, Y., Galleni, M., Ishiguro, M., Yamaguchi, K., Frère, J. M., Matsuzawa, H., & Sakai, H. (2003). Crystal structure of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase Toho-1: Insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and substrate specificity expansion. *Biochemistry*, 42(36), 10634–10643.  
<https://doi.org/10.1021/bi0342822>
- Jin, W., Wachino, J. I., Kimura, K., Yamada, K., & Arakawa, Y. (2014). New plasmid-mediated aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-Ia, and ESBL, TLA-3, from a *Serratia marcescens* clinical isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(5), 1331–1337.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dku537>
- Kabsch, W (2010). XDS. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- Kalp, M., Totir, M. A., Buynak, J. D., & Carey, P. R. (2009). Different intermediate populations formed by tazobactam, sulbactam, and clavulanate reacting with SHV-1 beta-lactamases: Raman crystallographic evidence. *Journal of the American Chemical Society*, 131(6), 2338–2347.  
<https://doi.org/10.1021/ja808311s>
- Karplus, A. (2012). Linking crystallographic model and data quality. *NIH Public Access. Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Kay Diederichs, A. K. (1997). Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Synchrotron Radiation News*, 28(6), 2–3.  
<https://doi.org/10.1080/08940886.2015.1101319>
- Kim, K. K., Kim, M. K., Lim, J. H., Park, H. Y., & Lee, S. T. (2005). Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(Pt 3), 1287–1293.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63541-0>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
- Kuzin, A. P., Nukaga, M., Nukaga, Y., Hujer, A., Bonomo, R. A., & Knox, J. R. (2001). Inhibition of the SHV-1  $\beta$ -lactamase by Sulfones: Crystallographic observation of two reaction intermediates with Tazobactam. *Biochemistry*, 40(6), 1861–1866. <https://doi.org/10.1021/bi0022745>
- Lafond, M., Couture, F., Vezina, G., & Levesque, R. C. (1989). Evolutionary perspectives on multiresistance  $\beta$ -lactamase transposons. *Journal of Bacteriology*, 171(12), 6423–6429. <https://doi.org/10.1128/jb.171.12.6423-6429.1989>
- Langan, P. S., Vandavasi, V. G., Cooper, S. J., Weiss, K. L., Ginell, S. L., Parks, J. M., & Coates, L. (2018). Substrate Binding Induces Conformational Changes in a Class A  $\beta$ -lactamase That Prime It for Catalysis. *ACS Catalysis*, 8(3),

- 2428–2437. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b04114>
- Laskowski, R. A., & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(10), 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
- Letunic, I., & Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1), 127–128. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>
- Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A review of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Neglected yet ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374>
- Liebschner, D., Afonine, P. V., Baker, M. L., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Croll, T. I., Hintze, B., Hung, L. W., Jain, S., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R. D., Poon, B. K., Prisant, M. G., Read, R. J., Richardson, J. S., Richardson, D. C., **Sammito, M. D., Sobolev, O. V., Stockwell, D. H., ... Adams, P. D. (2019).** Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology*, 75(Pt 10), 861–877. <https://doi.org/10.1107/S2059798319011471>.
- Madeira F, Park YM, Lee J., Buson N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A. R. N., Potter S. C., Finn R. D. & Lopez R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*. Jul;47(W1):W636-W641. DOI: 10.1093/nar/gkz268.
- Matthews BW. (1968). Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 33:491-497.
- Merida-Vieyra, J., De Colsa, A., Castañeda, Y. C., Barbosa, P. A., & Andrade, A. A. (2016). First report of group CTX-M-9 extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from pediatric patients in Mexico. *PLoS ONE*, 11(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168608>
- Meroueh, S. O., Fisher, J. F., Schlegel, H. B., & Mobashery, S. (2005). Ab initio QM/MM study of class A  $\beta$ -lactamase acylation: Dual participation of Glu 166 and Lys 73 in a concerted base promotion of Ser 70. *Journal of the American Chemical Society*, 127(44), 15397–15407. <https://doi.org/10.1021/ja051592u>
- Meroueh, S. O., Roblin, P., Golemi, D., Maveyraud, L., Vakulenko, S. B., Zhang, Y., Samama, J., & Mobashery, S. (2002a). *Molecular Dynamics at the Root of Expansion of Function in the M69L Inhibitor-Resistant TEM  $\beta$ -Lactamase from Escherichia coli*. 3, 9422–9430. <https://doi.org/10.1021/ja026547q>
- Meroueh, S. O., Roblin, P., Golemi, D., Maveyraud, L., Vakulenko, S. B., Zhang, Y., Samama, J. P., & Mobashery, S. (2002b). Molecular dynamics at the root of expansion of function in the M69L inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*, 124(32), 9422–9430. <https://doi.org/10.1021/ja026547q>
- Miani, A., Helfand, M. S., & Raugei, S. (2009). Ab initio Raman spectra of  $\beta$ -lactamase inhibitor intermediates bound to E166a SHV  $\beta$ -lactamase. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5(8), 2158–2172. <https://doi.org/10.1021/ct900131q>
- Morin, S and Gagne, M. (2009). *NMR Dynamics of PSE-4  $\beta$ -Lactamase : An Interplay of ps-ns Order and ms-ms Motions in the Active Site*. 96(June), 4681–4691. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.02.068>
- Morin, S., & Gagné, S. M. (2009). NMR dynamics of PSE-4  $\beta$ -lactamase: An

interplay of ps-ns order and  $\mu$ s-ms motions in the active site.

*Biophysical Journal*, 96(11), 4681–4691.

<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.02.068>

- Morrone J. J. 2013. Sistemática. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Prensas de Ciencias. Ciudad de México, México. ISBN: 978-607-02-4039-3
- Mukerji, R., Kakarala, R., Smith, S. J., & Kusz, H. G. (2016). Chryseobacterium indologenes: an emerging infection in the USA. *BMJ case reports*, 2016, bcr2016214486. <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-214486>
- Padayatti, P. S., Helfand, M. S., Totir, M. A., Carey, M. P., Carey, P. R., Bonomo, R. A., & Van Den Akker, F. (2005). High resolution crystal structures of the trans-enamine intermediates formed by sulbactam and clavulanic acid and E166A SHV-1  $\beta$ -lactamase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(41), 34900– 34907. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505333200>
- Pagan-Rodriguez, D., Zhou, X., Simmons, R., Bethel, C. R., Hujer, A. M., Helfand, M. S., Jin, Z., Guo, B., Anderson, V. E., Ng, L. M., & Bonomo, R. A. (2004). Tazobactam inactivation of SHV-1 and the inhibitor-resistant Ser 130  $\rightarrow$  Gly SHV-1  $\beta$ -lactamase: Insights into the mechanism of inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19494–19501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311669200>
- Palzkill, T. (2018). Structural and mechanistic basis for extended-spectrum drug-resistance mutations in altering the specificity of TEM, CTX-M, and KPC  $\beta$ -lactamases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5(FEB), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00016>
- Pan, X., He, Y., Lei, J., Huang, X., Zhao, Y., Hom, H., Kong, H., Health, H., Kong, T. H., Bay, C. W., Kong, H., Hong, T., Polytechnic, K., Hom, H., & Kong, H. (2017). Crystallographic snapshots of Class A  $\beta$ -lactamase catalysis reveal structural changes that facilitate  $\beta$ -lactam hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 1–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.764340>
- Pereira, R., Rabelo, V. W. H., Sibajev, A., Abreu, P. A., & Castro, H. C. (2018). Class A  $\beta$ -lactamases and inhibitors: In silico analysis of the binding mode and the relationship with resistance. *Journal of Biotechnology*, 279, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.005>
- Perrin, A., Larssonneur, E., Nicholson, A. C., Edwards, D. J., Gundlach, K. M., Whitney, A. M., Gulvik, C. A., Bell, M. E., Rendueles, O., Cury, J., Hugon, P., Clermont, D., Enouf, V., Loparev, V., Juieng, P., Monson, T., Warshauer, D., Elbadawi, L. I., Walters, M. S., Crist, M. B., Brisse, S. (2017). Evolutionary dynamics and genomic features of the Elizabethkingia anophelis 2015 to 2016 Wisconsin outbreak strain. *Nature communications*, 8, 15483. <https://doi.org/10.1038/ncomms15483>
- Petrosino, J. F., & Palzkill, T. (1996). Systematic mutagenesis of the active site omega loop of TEM-I  $\beta$ -lactamase. *Journal of Bacteriology*, 178(7), 1821– 1828. <https://doi.org/10.1128/JB.178.7.1821-1828.1996>
- Philippon, A., Slama, P., & Labia, R. (2016). A Structure-Based Classification of Class A  $\beta$ -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clinical Microbiology Reviews*. 29(1), 29–57. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-15>.Address
- Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E. B., Labia, R., & Nordmann, P. (1999). Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A

- extended-spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by an Escherichia coli integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(3), 573–581. <https://doi.org/10.1128/aac.43.3.573>
- Pucci, M. J., Bush, K., & Page, M. G. P. (2014). Cautious Optimism for the Antibacterial Pipeline. *Microbe Magazine*, 9(4), 147–152. <https://doi.org/10.1128/microbe.9.147.1>
- Rahman. (2018). The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9519718>
- Roccatano, D., Sbardella, G., Aschi, M., Amicosante, G., Bossa, C., Di Nola, A., & Mazza, F. (2005). Dynamical aspects of TEM-1  $\beta$ -Lactamase probed by molecular dynamics. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 19(5), 329–340. <https://doi.org/10.1007/s10822-005-7003-0>
- Ruggiero, M., Curto, L., Brunetti, F., Sauvage, E., Galleni, M., Power, P., & Gutkind, G. (2017). Mutations at Arg220 and Thr237 in PER-2  $\beta$ -lactamase: impact on conformation, activity and susceptibility to inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, March, AAC.02193-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02193-16>
- Ruggiero, M., Kerff, F., Herman, R., Sapunarcic, F., Galleni, M., Gutkind, G., Charlier, P., Sauvage, E., & Power, P. (2014). Crystal structure of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase PER-2 and insights into the role of specific **residues in the interaction with  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5994–6002. <https://doi.org/10.1128/AAC.00089-14>
- Rupp B. 2010. Biomolecular crystallography: principles, practice and applications to structural biology. Garland Science, Taylor & Francis Group. Abingdon, New York. ISBN-10 0815340818
- Sandanayaka, V. P., & Prashad, A. S. (2002). Resistance to beta-lactam antibiotics: structure and mechanism based design of beta-lactamase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 9(12), 1145–1165. <https://doi.org/10.2174/0929867023370031>
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
- Shimizu-Ibuka, A., Oishi, M., Yamada, S., Ishii, Y., Mura, K., Sakai, H., & Matsuzawa, H. (2011). Roles of residues Cys69, Asn104, Phe160, Gly232, Ser 237, and Asp240 in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase Toho-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 284–290. <https://doi.org/10.1128/AAC.00098-10>
- Silva-Sanchez, J., Garza-Ramos, J. U., Reyna-Flores, F., Sánchez-Perez, A., Rojas-Moreno, T., Andrade-Almaraz, V., Pastrana, J., Castro-Romero, J. I., Vinuesa, P., Barrios, H., & Cervantes, C. (2011). Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Causing Nosocomial Infections in Mexico. A Retrospective and Multicenter Study. *Archives of Medical Research*, 42(2), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2011.02.004>
- Silva, J., Aguilar, C., Ayala, G., Estrada, M. A., Garza-Ramos, U., Lara-Lemus, R.,

- & Ledezma, L. (2000). TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(4), 997–1003.
- Song, J. S., Jeon, J. H., Lee, J. H., Jeong, S. H., Jeong, B. C., Kim, S. J., Lee, J. H., & Lee, S. H. (2005). Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of Edison Seamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea). *Journal of microbiology* 43(2), 172–178.
- Stojanoski, V., Chow, D. C., Hu, L., Sankaran, B., Gilbert, H. F., Prasad, B. V. V., & Palzkill, T. (2015). A triple mutant in the  $\Omega$ -loop of TEM-1  $\beta$ -lactamase changes the substrate profile via a large conformational change and an altered general base for catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 290(16), 10382–10394. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633438>
- Sun, T., Bethel, C. R., Bonomo, R. A., & Knox, J. R. (2004). Inhibitor-resistant class A  $\beta$ -lactamases: Consequences of the ser130-to-gly mutation seen in apo and tazobactam structures of the SHV-1 variant. *Biochemistry*, 43(44), 14111–14117. <https://doi.org/10.1021/bi0487903>
- Tacconelli, E., & Magrini, N. (2017). Discovery research and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.*, vol. 18.
- Tetz G, Tetz V. (2018). Draft genome sequence of *Chryseobacterium mucoviscidosis* sp. nov. strain VT16-26, isolated from the bronchoalveolar lavage fluid of a patient with cystic fibrosis. *Genome Announc* 6:e01473-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01473-17>.
- Tillotson, G. (2017). A crucial list of pathogens. *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(17), 30753–30754. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30754-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30754-5)
- Tranier, S., Bouthors, A.-T., Maeyraud, L., Valerie, G., Sougakoff, W., & Samama, J.-P. (2000). The high-resolution crystal structure for class A  $\beta$ -lactamase PER-1 reveals the bases for its increase in breadth of activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 28075–28082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003802200>
- Tranier, S., Bouthors, A. T., Maveyraud, L., Guillet, V., Sougakoff, W., & Samama, J. P. (2000). The high resolution crystal structure for class A  $\beta$ -lactamase PER-1 reveals the bases for its increase in breadth of activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 28075–28082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003802200>
- Uc-Cachón, A. H., Gracida-Osorno, C., Luna-Chi, I. G., Jiménez-Guillermo, J. G., & Molina-Salinas, G. M. (2019). High Prevalence of Antimicrobial Resistance Among Gram-Negative Isolated Bacilli in Intensive Care Units at a Tertiary-Care Hospital in Yucatán Mexico. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(9), 588. <https://doi.org/10.3390/medicina55090588>
- Vahaboglu, H., Coskuncan, F., Tansel, O., Ozturk, R., Sahin, N., Koksai, I., Kocazeybek, B., Tatman-Otkun, M., Leblebicioglu, H., Ali Ozinel, M., Akalin, H., Kocagoz, S., & Korten, V. (2001). Clinical importance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 50(7), 642–645.
- van den Akker, F., & Bonomo, R. A. (2018). Exploring additional dimensions of

- complexity in inhibitor design for serine  $\beta$ -lactamases: Mechanistic and intra- and inter-molecular chemistry approaches. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00622>
- Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S., León-Chávez, B. A., Thompson-Bonilla, M. R., Guerrero-González, T., Gómez-Conde, E., Martínez-Fong, D., & González-Barrios, J. A. (2018). Characterization of gene families encoding beta-lactamases of gram-negative rods isolated from ready-to-eat vegetables in Mexico City. *High-Throughput*, 7(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/HT7040036>
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (1995). Ligplot: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*, 8(2), 127–134. <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033
- Watkins, R. R., Papp-Wallace, K. M., Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2013). Novel  $\beta$ -lactamase inhibitors: A therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4(DEC), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00392>
- WHO. (2014). Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(3), 383–394. <https://doi.org/10.1007/s13312-014-0374-3>
- Wilke, M. S., Lovering, A. L., & Strynadka, N. C. J. (2005).  $\beta$ -Lactam antibiotic resistance: A current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 8(5), 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016>
- Winkler, M. L., Rodkey, E. A., Taracila, M. A., Drawz, S. M., Bethel, C. R., Papp-wallace, K. M., Smith, K. M., Xu, Y., Jeffrey, R., Romagnoli, C., Caselli, E., Prati, F., Akker, F. Van Den, & Bonomo, R. A. (2014). Design and Exploration of Novel Boronic Acid Inhibitors Reveals Important Interactions with a Clavulanic Acid-Resistant Sulfhydryl-Variable (SHV)  $\beta$ -Lactamase. *NIH Public Access*, 56(3), 1084–1097. <https://doi.org/10.1021/jm301490d>
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., & Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 67(Pt 4), 235–242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
- Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolski, M. (2013). Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *FEBS Journal*, 280(22), 5705–5736. <https://doi.org/10.1111/febs.12495>
- Yang, Y., Rasmussen, B. A., & Shlaes, D. M. (1999). Class A beta-lactamases--enzyme-inhibitor interactions and resistance. *Pharmacol. Therapeut.*, 83(2), 141–151. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(99\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00027-3)
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 32, 361–385, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x>



Zeng, X., & Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00128>